ÜBER DIE BESTIMMUNG VON SPURENELEMENTEN IN HUMANPLAZENTEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Chemie
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ayrton Figueiredo Martins
aus Brasilien

Berlin 1978

ÜBER DIE BESTIMMUNG VON SPURENELEMENTEN IN HUMANPLAZENTEN

Inaugural-Dissertation
zur

Erlangung der Doktorwürde
des

Fachbereichs Chemie
der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ayrton Figueiredo Martins

aus Brasilien

Berlin 1978

Meiner Frau und meinem Sohn

gewidmet

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Referent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider

2. Referent: Prof. Dr. E. Riedel

Tag der mündlichen Prüfung: den 20.12.1978

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider

am Institut für Biochemie WE 6 im Rahmen des Abkommens UFSM-Brasilien / FU-Berlin angefertigt.

Vervielfältigt mit Unterstützung des Deutschen Akademischen Austauschdienstes.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider

danke ich für die Unterstützung der Arbeit sowie für viele wertvolle Anregungen.

Verzeichnis

1. Einleitung 6
2. Übersicht 9
2.1. Die Plazenta und ihre Funktion 9
2.2. Bedeutung der Spurenelemente 14
2.3. Wirkungsweise der Spurenelemente 25
2.4. Spurenelemente in der Umwelt und in den Lebensprozessen 31
3. Vorbereitung der Proben und Anwendung eines verbesserten Aufschlußverfahren 38
4. Spektralphotometrische Bestimmung von Spurenelementen der menschlichen Plazenta 45
4.1. Anwendung der spektralphotometrischen Bathocuproinmethode zur Bestimmung des Kupfergehaltes in Humanplazenten 47
4.2. Anwendung einer kombinierten extraktiv-spektralphotometrischen Methode zur Bestimmung des Zinkgehaltes in Humanplazenten 57
5. Atomabsorptionsspektralphotometrische Bestimmung von Spurenelementen der menschlichen Plazenta 69
5.1. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Zinkgehaltes in Humanplazenten 73
5.2. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Kupfergehaltes in Humanplazenten 81
5.3. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Cadmiumgehaltes in Humanplazenten 87
5.4. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Mangangehaltes in Humanplazenten 100

5.5. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptions-spektralphotometrie zur Bestimmung des Eisen-gehaltes in Humanplazenten 109
5.6. Anwendung der Flammen-Atomabsorptionsspektral-photometrie zur Bestimmung des Magnesiumgehaltes in Humanplazenten 123
6. Anwendung eines Trennung-Anreicherungsverfahrens für die Bestimmung von Schwerelementen durch die flammenlose Atomabsorptionsspektralphotometrie 136
6.1. Trennungs- und Anreicherungsverfahren für die zu untersuchenden Spurenelementen 138
6.2. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektral-photometrie zur Bestimmung des Bleigehaltes 146
6.3. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektral-photometrie zur Bestimmung des Quecksilbergehaltes 167
7. Diskussion 185
Literaturverzeichnis 193
Lebenslauf 207

1. Einleitung

Bei der Durchsicht der Literatur stellt man überraschend fest, daß bis heute weder von der menschlichen, noch von der tierischen Plazenta umfassende chemische Analysendaten vorliegen. Man hat sich vielmehr den komplexen Stoffwechselfragen gewidmet, ohne zu bemerken, daß für die Deutung vieler dabei gewonnener Ergebnisse eine quantitative Analyse des Plazentagewebes Voraussetzung ist. Somit ist die Plazentaforschung weit hinter der Erforschung der übrigen menschlichen Organe zurückgeblieben.

Wenn auch die Bedeutung der Spurenelemente seit längerer Zeit bekannt ist, so stehen wir hinsichtlich der Interpretation ihrer Wirkungsmechanismen heute noch vielfach am Anfang. Die Grundlage zur Klärung ihrer Funktion bildet aber eine genaue Kenntnis ihres mengenmäßigen Vorhandenseins, wofür eine besondere und verläßliche Untersuchungs- und Bestimmungstechnik erforderlich ist. Obwohl der Wichtigkeit der Spurenelemente in den letzten Jahren wachsende Aufmerksamkeit geschenkt wurde, ist über deren Erforschung in Plazenten eine weit verstreute und lückenhafte Literatur zu finden. Über die Bestimmung von Mikroelementen in Humanplazenten liegen wenige Arbeiten vor.

Besondere Bedeutung gewinnen mit der wachsenden Industrialisierung und den ansteigenden Bevölkerungszahlen in den Ballungsgebieten unserer Zeit umweltrelevante Spurenelemente. Das Ausmaß der Schwermetallbelastung unserer Umwelt ist alarmierend groß, und bei gleichbleibender Immissionssituation sind zunehmende Schäden an Ökosystemen zu erwarten. Mit Ausnahme der Arbeiten von R. Thieme u. Mitarb., die auf eine regionale Abhängigkeit der Schwermetallkontamination der Humanplazenta hinweisen, wurde bisher kaum den Gefahren Beachtung geschenkt, die durch Schwermetalleinlagerung in der Plazenta und in fetalen Organen entstehen.

Die genaue Untersuchung des Gehaltes an Spurenelementen ist in jüngster Zeit im klinisch-chemischen Laboratorium unerläßlich geworden. Meistens werden wegen des apparativen Aufwandes immer noch spektralphotometrische Methoden bevorzugt, obwohl andere Verfahren, wie z.B. die Atom-Absorptions-Spektroskopie und elektroanalytische und insbesondere radiometrische Methoden, eine stetig steigende Anwendung finden. Bei der extremen Spurenanalyse erfreuen sich neben den atomspektroskopischen auch die elektroanalytischen Verfahren einer Renaissance.

Erhebliche Anstrengungen werden derzeit unternommen, um spezifische Analysenverfahren zu entwickeln. Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, daß die meisten routinemäßig eingesetzten Methoden nicht spezifisch genug sind; besonders wenn unbekannte endogene Störsubstanzen in der Probe vorkommen. Die größten Probleme bereiten aber systematische Fehler der Methoden, die nicht leicht aufzuspüren sind, und um so schwerwiegender die analytischen Aussagen belasten, je kleiner die zu bestimmenden absoluten Mengen der Elemente sind.

Die vorliegende Dissertation reiht sich ein in die Untersuchungen von Plazenta-Inhaltstoffen, die seit längerer Zeit im Institut für Biochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider durchgeführt werden*. Sie ist auch in gewisser Hinsicht eine Fortsetzung der Diplomarbeit, in der die Anwendung von spektroskopischen Methoden (Spektralphotometrie, Atom-Absorptions-Spektroskopie, Emissionsspektrographie und Röntgenfluoreszenzanalyse) zur Bestimmung von Spurenelementen in Bodenproben untersucht wurde. Bei der Dissertation wollen wir nun, in der Bestrebung, empfindliche Lücken der Humanplazentaforschung zu schließen, die folgenden Hauptziele verfolgen:

- Die Lücken in der Aufstellung der quantitativen Spurenelement-Zusammensetzung der normalen menschlichen Plazenta als Beitrag zu ihrer Physiologie an einem ausreichend großen Untersuchungsgut weiter schließen helfen.

---

* Z.B. l.c. |318|

- Die einfachsten und dabei geeigneten analytischen Methoden zur Untersuchung geringster Mengen von Elementen neben einem um viele Zehnerpotenzen größeren Hauptbestandteil (Matrix) herauszuforschen.
- Um die systematischen Fehler von vornherein auszuschalten, eine Optimierung einzelner Verfahren versuchen, damit man genauere Ergebnisse für die normalen Konzentrationswerte der Spurenelemente der Humanplazenta erzielen kann.
- Den Kontaminationsgrad der Humanplazenten mit Schwermetallen in dem umweltbelasteten Raum Berlin (West) erforschen.

Die vorliegende Arbeit über die Bestimmung von Spurenelementen in Humanplazenten wird als Grundlage für zukünftige Forschungen, im Rahmen der Spurenanalyse von biologischen Materialien in unserem Institut, betrachtet. Auf Grund dieser Tatsache wurde hier ein möglichst einfacher Arbeitsgang für ein normales klinisch-chemisches Laboratorium herausgearbeitet.

Ferner ist es nicht Zweck dieser Arbeit, hier einzelne Spurenanalysenverfahren gegeneinander abzuwägen und zu vergleichen, sondern es soll über die Einsatzmöglichkeit der Methoden zur Bestimmung von Spurenelementen in Humanplazenten berichtet werden.

2. Übersicht

2.1. Die Plazenta und ihre Funktion:

Die Plazenta ist ein hochdifferenziertes Organ, das der Atmung und Ernährung der Frucht und dem Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus dient. Außerdem ist die Plazenta eine hochwirksame Drüse mit innerer Sekretion. Sie bewältigt als "Zwischenorgan auf Zeit" zwischen Mutter und Kind vielfältige Funktionen, obgleich sie nur für kurze Zeit angelegt wird und bald wieder verschwindet (1).

Am Ende der Gravidität ist der Mutterkuchen ein flaches, scheibenförmiges, schwammiges Organ von kreisrunder, ovaler oder unregelmäßiger Form. Sie besteht aus fetalem und mütterlichem Gewebe (Abb. 1 und 2). An dem geborenen Mutterkuchen unterscheidet man eine fetale Seite, die während der intrauterinen Zeit der Frucht zugekehrt ist, und eine materne Fläche, die im Uterus der Gebärmutterwand anhaftet. Die fetale Seite zeigt die Ansatzstelle der Nabelschnur und ist von dem glatten, durchsichtigen Amnion bedeckt, das die chorialen Gefäße durchscheinen läßt.

Die mütterliche Seite der Plazenta ist hochrot und unmittelbar nach der Geburt meist mit Blut bedeckt, Teilen des retroplazentaren Hämatoms. Sie zeigt bei Betrachtung aus der Nähe einen matten, weißlichen Schimmer, der von einem dünnen, aus Dezidus bestehenden Überzug stammt. Das Vorhandensein dieses Überzuges beweist die Vollständigkeit der Plazenta. Die mütterliche Fläche ist durch zahlreiche Furchen oder Sulci unterteilt. Sie entstehen erst nach der Ablösung der Plazenta von der Uteruswand, sind also Kunstprodukte. In situ sind sie von fetalem Gewebe, den Plazentasepten, ausgefüllt. Die Sulci umgrenzen die Plazentalappen oder Kotyledonen, deren Zahl etwa 15 bis 30 beträgt.

Der Aufbau der Plazenta zeigt beim Menschen und bei den verschiedenen Tierarten große Unterschiede. Je nach der Zahl der Schichten, die das mütterliche und das fetale Blut tren-

Abb. 1

Reife Plazenta, die dem Kind zugewandte Seite

Abb. 2

Reife Plazenta, die der Mutter zugewandte Seite

nen, werden epithelio-choriale, syndesmo-choriale, endotheliochoriale, hämo-choriale und hämo-endotheliale Plazenten unterschieden. Die Plazenta des Menschen ist eine hämochoriale, das heißt, das Chorionepithel kommt mit dem mütterlichen Blut in Berührung.

In der Plazenta fließen fetales und mütterliches Blut dicht aneinander vorbei, getrennt nur durch extrem dünne Scheidewände, die den Stoffaustausch bewerkstelligen. Diese Stoffwechselmembran, bestehend aus dem Chorionepithel, den Zottenstroma und dem Endothel der fetalen Zottenkapilare, hat eine Dicke von 20 bis 30μ bei der jugendlichen und von 2 bis 5μ bei der reifen Plazenta, so daß die Austauschvorgänge mit fortschreitender Reife der Plazenta schneller ablaufen können. Die Kreisläufe von Mutter und Kind sind getrennte selbständige Systeme. Doch dürfte die Schranke nicht unüberwindbar sein, wie aus dem Nachweis von fetalem Hämoglobin und von fetalem Erythrozyten im Retroplazentarblut und im strömenden Blut der Mutter hervorgeht.

Die Plazenta hat resorptive, exkretorische und inkretorische Aufgaben. Der Stoffaustausch zwischen den beiden voneinander getrennten Flußsystemen spielt sich weitgehend nach dem Diffusionsprizip ab, das heißt, in Richtung des Konzentrationsgefälles (passive Stoffbewegung). Die Plazenta hat aber auch die Fähigkeit, Stoffe entgegen dem Konzentrationsgefälle, also "bergauf", zu transportieren (aktiver Stofftransport). Diese Eigenschaft gehört zu den Grundfunktionen aller lebenden Zellen.

Der Mutterkuchen ist aber nicht nur Aufnahme-, sondern auch Ausscheidungsorgan. Die Abbauprodukte des Stoffwechsels gelangen durch die Plazenta in das Blut der Mutter und werden durch die mütterliche Haut, Lunge, Nieren und Darm ausgeschieden.

Schließlich bildet die Plazenta selbst Hormone: Als innersekretorische Drüse hat die Plazenta die Aufgabe, die Schwangerschaftsveränderungen im mütterlichen Organismus zu unterhalten und zu steuern. Da nervöse Verbindungen zwischen

Mutter und Frucht fehlen und die Plazenta keinerlei Nerven führt, muß diese Einflußnahme auf hormonalem Wege erfolgen. Das Plazentagewebe besitzt die Fähigkeit, östrogene, gestagene und androgene Substanzen sowie Corticosteroide zu bilden.

Insgesamt gesehen hat die Plazenta sehr mannigfache Aufgaben zu erfüllen (2). Sie ist Hauptstoffwechselorgan (Hilfsleber) und übernimmt gleichzeitig die Rolle der Niere (Exkretion), des Darmes (Resorption) und der Lunge (Atmung) für den Keimling. Sie ist weiterhin Bildungsstätte von Hormonen. Diese Vielfalt der Aufgaben mag die Komplikation der Feinstruktur des Organes verständlich erscheinen lassen.

Der Austausch von Nährstoffen zwischen kindlichem und mütterlichem Kreislauf hat seine Analogie in den Vorgängen des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe beim Einzelindividuum. So werden diese Prozesse auch von analogen physikalisch-chemischen Gesetzmäßigkeiten beherrscht. Die Nahrungsstoffe für den Fetus werden dem mütterlichen Bestand entnommen und dem kindlichen Organismus zugeführt. Die Abgabe fetaler Stoffwechselschlacken erfolgt ebenfalls über die Plazenta. Die Plazenta ist nicht ausschließlich eine nach Diffusionsgesetzen arbeitende Membran ("Molekülsieb"); sie ist auch aktiv an den Stoffwechselprozessen beteiligt. Sie hat also die Funktionen zu leisten, die im erwachsenen Organismus Atmungsorgane, Darmkanal, Leber und Niere durchführen. Darüber hinaus ist die Plazenta eine wichtige biologische Schutzeinrichtung für das Kind, die den Übertritt vieler schädlicher Stoffe in den fetalen Kreislauf verhindert.

Eine befriedigende Darstellung der mannigfachen Austausch- und Stoffwechselfunktionen der Plazenta ist heutzutage immer noch nicht möglich. Sicher ist aber, daß der diaplazentare Stofftransport ganz verschieden ablaufen kann und daß die bestimmenden Faktoren sind: (a) Natur und Molekulargröße der übertretenden Substanz; (b) Struktur und Beschaffenheit der Plazenta-Membran; diese ist artspezifisch und alterspezifisch.

Für den Austausch der Ionen glaubte man im allgemeinen,

mit einem Übergang durch Diffusion auskommen zu können. Doch zeigen Untersuchungen mit markierten Substanzen, daß der Austausch auch für diese Stoffe nicht frei ist. Relativ gut bekannt sind die Vorgänge bei der Eisenaufnahme, da sich Fe gut histochemisch nachweisen läßt. Verabreicht man der Mutter z.B. markiertes Eisen, so ist dieses bereits nach 10 Minuten im Feten nachweisbar.

Über die Plazenta gelangen auch körperfremde Substanzen des mütterlichen Blutes in den Fetus, soweit sie die Schranke des Chorionepithels zu durchwandern vermögen. Der Übertritt von körperfremden Stoffen in die Frucht ermöglicht auf der anderen Seite aber auch eine therapeutische Einwirkung auf den Fetus durch Einbringen von Medikamenten in den Organismus der Mutter, was z.B. bei der Behandlung der Syphilis eine große Rolle spielt.

Der Embryo entwickelt sich also nicht unabhängig von äußeren Einflüssen. Der Keim ist bereits ein lebender Organismus, der sich, wie jedes Lebewesen, mit seiner Umwelt auseinandersetzen muß und auf Umwelteinflüsse mit Anpassungserscheinungen reagiert, und zwar schon in den frühesten Entwicklungsstadien.

2.2. Bedeutung der Spurenelemente:

Eine große Anzahl von Elementen sind in lebenden Geweben in so kleinen Mengen anwesend, daß es mit den früher zur Verfügung stehenden analytischen Methoden unmöglich war, ihre Konzentration zu bestimmen (3). Solche Elemente wurden deshalb als "in Spuren vorhanden" bezeichnet. Die Bezeichnung "biologisch wirksame Spurenelemente" oder kurz "Spurenelemente" ist trotz ihrer Ungenauigkeit allgemein akzeptiert und angewendet, obwohl heutzutage die meisten von ihnen in biologischen Materialien genau erfaßbar sind.

Das größte Hindernis, das einer routinemäßigen Bestimmung der Spurenelemente lange Zeit entgegen stand, war der zu große Probenbedarf und die Notwendigkeit einer mehr oder weniger aufwendigen Probenvorbereitung. Dank der Entwicklung empfindlicher Methoden, insbesondere diejenigen der Atomabsorptionsspektroskopie und der Neutronen-Aktivierungsanalyse, sind in jüngster Zeit viele Fortschritte in der Spurenanalyse gemacht worden. Noch weitere Fortschritte hängen in erster Linie von einer breiteren Anwendung gegenwärtiger und der Ausarbeitung neuer, empfindlicher, zugänglicher Methoden ab.

Die systematische Einteilung der Spurenelemente ist mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden, da ihre einzige Gemeinsamkeit darin besteht, daß sie in Zellen von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren in geringen Konzentrationen vorkommen. Die Höhe der Konzentration unterscheidet sich - unter Umständen ganz erheblich - von Element zu Element, von Organ zu Organ und von Species zu Species. Selbst einige offenbar nicht lebensnotwendige Spurenelemente kommen im Blut und in Geweben des Organismus in Konzentrationen vor, die höher sind als die der essentiellen Spurenelemente.

Es gibt keine Grenze, die Spuren- und Hauptelemente trennt. Diejenigen Elemente, deren Konzentrationen in lebenden Geweben sehr häufig in $\mu g.g^{-1}$ und $\mu g.ml^{-1}$ angegeben werden, sind im allgemeinen als Spurenelemente zu bezeichnen. Diese Konzentrationen sind um mehrere Größenordnungen kleiner als

die typischen für Makroelemente.

Die Einteilung von Spurenelementen in essentielle, nichtessentielle und toxische ist ungenau und verwirrend (4). Alle essentiellen Spurenelemente wirken in hohen Konzentrationen durchaus toxisch, und der Grenzbereich zwischen den Niveaus, welche als wohltuend und schädlich bezeichnet werden können, ist meistens sehr schmal. Es erscheint also nicht verwunderlich, wenn bekannte toxische Spurenelemente in der Zukunft als wohltuend oder essentiell anerkannt werden.

In der heutigen Zeit können mit Sicherheit 11 Elemente beim Menschen als lebensnotwendig bezeichnet werden (Fe, Cu, Mo, Co, Zn, Mn, Cr, Sn, Se, I, V); bei einer Reihe anderer (Si, Al, Ni, Ge) werden derzeit intensive Untersuchungen zur Klärung dieser Frage durchgeführt. Als möglicherweise essentiell werden die Elemente F, Ni, Br, As, Cd, Ba, Sr, Si und Al betrachtet, als nichtessentiell Sb, Pb und Hg. Neben diesen Elementen werden auch einige "indifferente" Elemente in Körperflüssigkeiten bestimmt, da sie dem Körper therapeutisch zugefügt werden. Zum Beispiel wird Au zur Behandlung von Gelenkrheumatismus und Li sowohl wie Rb zur Therapie von Psychosen verabreicht (s. Abb. 3).

Es ist sehr schwierig, experimentell festzustellen, ob ein Mikroelement essentiell ist, da oft die geringsten Mengen des Elementes ausreichen, um Mangelerscheinungen des Organismus zu verhindern (5). Ganz offensichtlich genügen bei Versuchstieren die im Staub und in anderen Verunreinigungen enthaltenen Mengen an Spurenelementen, um einen Mangelzustand vollständig zu vermeiden. Folglich ist zu erwarten, daß einige heute als Kontaminante bezeichnete Spurenelemente, welche den Einfluß von umweltbelastenden Schadstoffen auf belebte Organismen widerspiegeln, in der Zukunft vielleicht als essentiell angesehen werden. Die Elemente Sn, Ni, V, Si, und F sind z.B. erst in den letzten Jahren als essentiell vermutet worden. Ebenso muß berücksichtigt werden, daß ein "indifferentes" Element heute vielleicht nur deshalb als indifferent angesehen wird, weil seine Bedeutung im menschlichen Körper noch nicht

H																He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	J	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															
			Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
			Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	

Abb. 3

Das Periodische System der Elemente / Die im tierischen Organismus eine Funktion ausübenden Elemente sind unterstrichen worden

erkannt wird. Während außerdem einige Spurenelemente für alle Lebewesen essentiell sind (wie z.B. Fe und Zn), sind andere nur für bestimmte Gruppen lebensnotwendig. So wird Jod von den meisten Pflanzen nicht benötigt, Bor dagegen nur von Tieren.

Die zunehmende Umweltbelastung mit verschiedenen toxischen Elementen, wie z.B. Pb, Cd, Hg, Sb und As, als Folge der fortschreitenden Industrialisierung und Motorisierung in Stadtgebieten, wie auch die rasche Ausnutzung von fossilen Energieträgern, ist ein öffentliches Gesundheitsproblem. Sehr wenig ist heutzutage über eine Exponierung des Menschen auf lange Frist zu umwelt-relevanten Elementen bekannt, insbesondere bei Nahrungs-, Wasser- und Luftaufnahme. Die Gefahr einzelner toxischer Spurenelemente auf die Gesundheit des menschlichen Organismus ist sehr schwer zu beurteilen. Es besteht auch die Möglichkeit von Zwischenwirkungen der toxischen Elemente untereinander und mit den essentiellen Spurenelementen und Nutrienten. Ähnlich beeinflußt wird ein "angemessenes" Gehaltsniveau eines essentiellen Spurenelementes durch die Anwesenheit anderer zwischenwirkender Elemente in der menschlichen Umwelt.

Es gibt dabei mindestens 3 Gründe für eine eingehende Untersuchung von Spurenelementen: a) Zu niedrige Konzentrationen, die durch eine zu geringe Aufnahme mit der Nahrung oder durch Störungen im Metabolismus entstanden sind, können Mangelerkrankungen hervorrufen; b) zu hohe Konzentrationen, welche durch eine zu hohe Aufnahme aus der Umwelt oder durch Störungen im Metabolismus entstanden sind, können toxische Effekte hervorrufen; c) abnorme Konzentrationen können schließlich auch durch gewisse Erkrankungen hervorgerufen werden und bieten damit vielleicht einen Weg zum besseren Verständnis dieser Erkrankungen. Mannigfache und komplexe gegenseitige Abhängigkeiten von Elementen lassen ferner Platz für wichtige Vermutungen über die Rolle des Zwischenverhältnisses von Metallspuren in der Nutrition und für den Gesundheitszustand des Menschen. Die Abwesenheit eines Metalls in der Diät kann beispielsweise großen Einfluß (positiv oder ne-

gativ) auf die Nutzung anderer Metalle auslösen (z.B. Synergismus von Cu im Eisenstoffwechsel). Als Beispiel für Antagonismus kann man die Zwischenwirkung von Cu und Zn nehmen (offenbar können Zn und Mo Kupfer in Lebensprozessen ersetzen, wobei eine Konkurrenz bei der Plazierung in metallbindenden Proteinen in Leber und Därmen stattfindet). Schließlich kann man aufgrund neuer Untersuchungen die Entdeckung von unerwarteten Metallenzymen von z.B. V, Sn, Cr und Se voraussagen sowie neue Verbindungen oder Enzymsysteme von F und Si.

Das Ziel der Ernährungsforschung ist es, der Bevölkerung eine optimale Diät-Aufnahme von essentiellen Nutrienten zu sichern und Überexponierung von anderen zu verhindern (6). Falsche Ernährung hat jedoch heutzutage neue Nutritionsprobleme hervorgerufen. Die heutigen Lebensmittel, die durch vielfältige Veredelungsprozesse verarmen und gleichzeitig mit vielen Fremdstoffen kontaminiert werden, benötigen ausführliche Untersuchungen des Mineralgehaltes, da die Kenntnisse über das menschliche Bedürfnis an Spurenelementen weitgehend lückenhaft sind. Das betrifft besonders Elemente wie V, Ni, Si, F und Sn, die erst in jüngster Zeit als essentiell für Versuchstiere befunden wurden und die für Menschen als ebenso unerläßlich vermutet werden (4). Die Aufstellung des Bedarfs an Spurenelementen in der Nahrung des gesunden Menschen ist nur dann sinnvoll, wenn gleichzeitig mitgeteilt wird, welche Mengen welcher Nahrungsmittel verzehrt werden müssen, um diesen Bedarf zu decken. Hinzu kommt, daß von der zur Resorption angebotenen Menge nur ein Teil resorbiert wird. Dieser Anteil ist wesentlich von der Zusammensetzung der Nahrung und dem Bestand des Elementes im Organismus abhängig. Sicher aber ist, daß der Bedarf an Mikroelementen in der Schwangerschaft und während der Stillzeit wegen des Verbrauchs durch den Fetus bzw. Säugling erhöht ist. Von medizinischem Interesse sind Mikroelemente bei der Ernährung des gesunden und kranken Menschen. Insbesondere in Gegenden, in denen Menschen an Protein- und Energiemangelernährung leiden, treten nicht selten Spurenelementmangelzustände auf. Auch bei der

Ernährung des kranken Menschen, z.B. auf parenteralem Weg oder mit speziellen Diäten (z.B. bei genetischen Stoffwechseldefekten), wird in jüngster Zeit vermehrtes Augenmerk auf die ausreichende Versorgung mit Mikroelementen gelegt. Außerdem liegt eine Reihe epidemiologischer Studien vor, nach denen die erhöhte Konzentration einzelner Spurenelemente (z.B. Se) in der Nahrung und im Trinkwasser das Auftreten verschiedener Krankheiten (z.B. Magenkrebs und kardiovasculäre Schäden) verhindern soll. Auf der anderen Seite wirken einige Mikroelemente, wie bereits gesagt, schon in geringsten Mengen toxisch. Da sie häufig in industriellen Produktionsstätten als Abfallprodukte in großen Mengen auftreten, besteht die mit dem industriellen Wachstum zunehmende Gefahr einer Verseuchung großer Bevölkerungsteile. Tatsächlich ist es bereits an verschiedenen Stellen der Erde zu entsprechenden Katastrophen gekommen. So starben hunderte Japaner an der Itai-Itai-Krankheit, einer Cadmiumvergiftung. Das Cadmium stammte aus Abwässern einer Zinkraffinerie, die zur Bewässerung von Reisfeldern verwendet wurden. In einem ähnlichen Fall führte die Verseuchung von Meerwasser mit Quecksilber (Minamata-Bucht) zu einer derartigen Anreicherung dieses Metalls in den dort gefangenen Fischen, daß nach dem Verzehr schwerste Quecksilbervergiftungen auftraten.

Der Stoffwechsel der Spurenelemente, d.h. die Aufnahme in den Organismus durch Nahrung, Trinkwasser und Luft, die Ausscheidung und Verteilung im Blut und Gewebe sind bisher nur unzureichend untersucht worden (s. Tabelle 1, 2, 3 und 4). Da Spurenelemente in hohen Konzentrationen durch ihre katalytischen Eigenschaften und z.B. durch ihre Neigung, HS-Gruppen zu blockieren, toxisch wirken, ist ihre Konzentration ähnlich wie die der Protonen einer genauen, bisher im Detail noch nicht bekannten Regulation unterworfen, an der mit Sicherheit auch Hormone beteiligt sind.

Bis vor kurzer Zeit wurde geglaubt, die belebte Natur umfasse insgesamt 20 essentielle Elemente. Inzwischen weiß man, daß noch weitere 5 Elemente unerläßlich sind: F, Si, Sn,

V und Ni. Die Rolle der Spurenelemente bleibt nicht nur deswegen in verschiedenen Fällen immer noch unklar oder sogar unbekannt. Diese lückenhaften Kenntnisse können insbesondere heutzutage kritisch werden, da die Biosphäre zunehmend von Chemikalien kontaminiert wird und eine potentiell gefährliche Redistribution von Salzen und Metallionen stattfindet. Neue exoktische Metallverbindungen wie Methylquecksilber und eine Serie kompetitiver synergistischer Verhältnisse von Mineralsalzen werden derzeit aufgefunden, und gleichzeitig müssen wir unsere Unwissenheit über die Wirkungsweise unseres chemischen Milieus auf die biologischen Vorgänge eingestehen.

Nur drei von den essentiellen Elementen haben eine Ordnungszahl über 34: Mo (42), Sn (50) und I (53). Die vier meist vorkommenden Elemente sind bekanntlich H, C, O und N (O.Z. = 1, 6, 7, 8); die darauffolgenden sieben meist vorkommenden Elemente haben alle Ordnungszahlen unter 21 (Ca, P, K, S, Na, Mg, Cl) und die übrigbleibenden elf Elemente (V, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Se, Sn, Ni) werden nur in Spuren in der belebten Natur benötigt.

Die meisten Spurenelemente haben Ordnungszahlen zwischen 23 und 34. In diese Serie sind drei Elemente einbezogen, die keine Rolle in der belebten Natur zu spielen scheinen: Ga, Ge und As. Gallium ist dem Al und In ähnlich, die auch keine Bedeutung für den belebten Organismus zu haben scheinen. Andererseits sind Si und Sn ähnlich dem Ge; es ist möglich, daß dem letztgenannten Element wegen seiner Seltenheit noch eine essentielle Funktion zuerkannt wird. As ist allerdings als wichtiges Gift erkannt.

Anmerkungen:

Die wichtigsten Aufgaben der Mineralstoffe in der lebenden Zelle sind:

1. Aufrechterhaltung der Elektronenneutralität,
2. Aufrechterhaltung eines bestimmten osmotischen Druckes,
3. Schaffung bestimmter Löslichkeitsbedingungen für die Kolloide,
4. Aufbau von Puffersystemen,
5. Ermöglichung der Reizbarkeit und Beantwortung von Reizen,
6. Beeinflussung der Stoffwechselprozesse durch Hemmung oder Förderung von Enzymsystemen.

Mit der Entwicklung der Biochemie, insbesondere der Enzymologie, hat die Erkenntnis der Lebensnotwendigkeit der anorganischen Substanzen, und hier speziell der Spurenelemente, zur Sicherheit des Reaktionsablaufs biologischer Systeme in den Zellen immer mehr Raum gewonnen. Wir dürfen in diesem Sinn die Spurenelemente beurteilen als:

a) Katalysatoren der Enzyme, und zwar als prostetische Gruppe,
b) Wirkungsgruppe einer prostetischen Gruppe,
c) Substanz, welche die Vorstufe eines Enzyms in die aktive Form überführt,
d) Substanz, welche ein Enzymmolekül katalytisch leistungsfähiger macht,
e) Stabilisator des Enzymproteins,
f) Schutzstoff infolge Komplexbildung mit Enzymbestandteilen und schließlich auch als
g) Hemmstoff.

Der Energieumsatz im Leben kann zuletzt nur durch das Zusammenwirken organischer und anorganischer Vitalstoffe zustande kommen, wobei die anorganischen über den Weg amphoterer Reaktionen der Proteine in die Zellen oder von Zelle zu Zelle transportiert werden.

Körperfremde und schädliche Elemente sind vom Gesichtspunkt des Lebensmittelchemikers in erster Linie Pb und Hg,

daneben eine Reihe von "Metallgiften" wie Be, Uranylsalze, Se, Te, Th, Cd, Zn, die z.T. im Organismus gespeichert werden, und deren Eliminierung, insbesondere auch aus dem Lebensbereich des Industriearbeiters und des Großstadtmenschen, eine wesentliche Aufgabe der Gesundheitserhaltung darstellt. Sie gelangen meist zivilisatorisch bedingt in unsere Lebensmittel (das gilt besonders für Pb und Hg); ihr Fernhalten aus der Nahrung, dem Wasser und der Luft ist im Rahmen des höchst aktuell gewordenen Umweltschutzes mit allem Nachdruck zu fordern.

Tabelle 1 Bestand des Menschen an Spurenelementen (190)

Element	Gesamtbestand mg	Gesamtbestand µg/kg	Gesamtbestand (mg) Blut	Plasma	Ery	Konzentration im Plasma (µg/100 ml)
Essentiell						
Fe	4200	60	2500	3,6	2400	114
Zn	2300	33	34	5,6	2,8	98
Cu	72	1,0	5,6	5,5	2,2	116
V	18	0,3	0,088	0,031	0,057	1,0
Se	13	0,2	1,1			1,1
Mn	12	0,2	0,14	0,025	0,12	0,83
J	11	0,2		2,6	0,35	8,7
Ni	10	0,1	0,16	0,08	0,07	0,42
Mo	9,3	0,1	0,083			0,4
Cr	1,7	0,02	0,14	0,074	0,044	2,8
Co	1,5	0,02	0,0017	0,0014	0,00034	0,018
Essentiell ?						
F	2600	37	0,095	0,87	0,17	2,8
Nicht Essentiell						
Rb	320	4,6	14	2,2	12	
Br	200	2,9	24	17	7,5	
Al	61	0,9	1,9	1,3	0,14	
B	48	0,7	0,52			
Ba	22	0,3	1,0	0,52		
Ti	9	0,1	0,14	0,12	0,08	
Au	10	0,1	0,00021			
Sb	7,9	0,1	2,0			
Cs	1,5	0,02	0,015			
U	0,1	0,001				
Be	0,036					

Tabelle 2 Übersicht über die im menschlichen Organismus aufgefundenen Spurenelemente.

Physiol. Funktion bekannt	Ohne physiol. Funktion Entbehrlichkeit erwiesen	Toxisch wirk. Spurenelemente
Chrom	Aluminium	Antimon
Eisen	Barium	Arsen
Kobalt (als Vit. B_{12})	Beryllium	Blei
Kupfer	Bor	Cadmium
Mangan	Brom	Quecksilber
Molybdän	Cesium	Thalium
Nickel	Edelgase	
Selen	Gold	
Silicium	Lithium	
Vanadium	Platinmetalle	
Zink	Rubidium	
Zinn	Silber	
Jod	Strontium	
Fluor (?)	Tellur, Titan	

Tabelle 3 Normalwerte des Gehalts des Menschen an Spurenelementen (µg/100 g Feuchtgewicht) (190)

Element	Leber	Niere	Muskel	Herz	Lunge	Gehirn
Al	80-200	30-150	15-100	60-200	50-100	4-50
As	2-3	2-4	2-3	2-3	2-3	2-4
Pb	50	100	50	50	100	50
B	13	20-35	14	4	6-7	
Br	200-750	350-830		550-630	400-550	200-500
Cd	40-390	120-1500	1-10	2-25	2-45	1-40
F	40-300	6-200	20-120	20-120	90-170	60-70
J	5-7	5-7	3-5	5-7	5-7	2-3
Co	2,5	2,5-11	0,5-1	3	3	4
Cu	120-900	100-140	20-120	70-250	35-150	200-400
Mn	100-400	20-200	10-50	10-30	10-40	30-40
Mo	3-70	14-28				Spur
Hg	1-12	2-50	0,1-4,0	0,1-1,0	0,5-0,9	0,5-13
Rb x 10^3	5-18	5-13	10-15	2-13	6-16	6-14
Se	0,18-0,66	0,6	0,25-0,60	0,22	0,21	0,27
Te x 10^3	3-43	3-21	12-35	6-24	2-35	5-32
Zn	60-300	20-200	10-150	20-200	200-300	50-200
Sn	3-5	3-5	3-5	2	1-2	0,5-2,0

Tabelle 4 Aufnahme und Ausscheidung von Spurenelementen durch den Menschen (190)

Element	Aufnahme (mg/Tag)	Ausscheidung Harn (mg/Tag)	Ausscheidung Schweiß (mg/Tag)	Gehalt Haar (µg/g)
Essentiell				
Fe	15	0,25	0,5	130
Zn	8-15	0,5	5,1	107-172
Mn	2,2-8,8	0,225	0,1	1,0
Sn	4,0	0,023	2,23	
Cu	3,2	0,06	1,6	16-56
V	2,0	0,015	1,0	
Ni	0,4	0,011	0,08	0,0075
Co	0,3	0,26	0,017	0,17-0,28
Mo	0,3	0,15	0,06	
J	0,2	0,175	0,006	0,015
Cr	0,1	0,008	0,059	0,6-1,0
Se	0,07	0,04		0,05
F (?)	2,5	1,6	0,56	
Nicht essentiell				
Al	45	0,1	6,1	5
Br	7,5	7,0	0,2	12,5
Zr	4,2	0,14		
Li	2,0	0,8	(+)	
Sr	2,0	0,2	0,96	0,05
Rb	1,5	1,1	0,05	
B	1,3	1,0		
Ba	1,25	0,023	0,085	5
Be	0,013	0,0013		
Te	0,12	0,05		
Ti	0,85	0,33	0,001	0,05

2.3. Wirkungsweise der Spurenelemente

Die meisten Spurenelemente, die mit wenigen Ausnahmen Übergangsmetalle sind, wirken vorwiegend als Katalysatoren in Enzymsystemen der Zelle (3). Nahezu 30% aller Enzyme enthalten ein Metallion als wesentlichen Bestandteil. Dieser Prozentsatz hat sich jedoch in letzter Zeit dank der Anwendung neuer empfindlicherer Methoden zur Metallanalyse in biologischen Systemen ständig vergrößert.

Alle Übergangsmetalle haben teilweise gefüllte 3d, 4d oder 5d Unterschalen. Es ist hauptsächlich diese Eigenschaft der Übergangsmetalle und ihrer Ionen, die für viele ihrer einzigartigen Eigenschaften verantwortlich ist, insbesondere die große Anzahl von Oxidationsstufen (7).

Die verschiedenen Oxidationsstufen entstehen durch die unterschiedliche Zahl der Elektronen, die sowohl von der ns als auch von der (n-1)d Unterschale eines metallischen Elementes abgegeben werden kann. In kovalent gebundenen Molekülen oder komplexen Ionen kann die Oxidationsstufe bis auf +8 anwachsen. Wenn Ionen oder Moleküle ein Übergangsmetallion eng umgeben, so sind die "d" Orbitale nicht länger degeneriert, sie spalten sich in Energien entsprechend der Natur und der geometrischen Anordnung der Ionen oder Moleküle. Allgemein ergibt sich aus dieser Situation, daß Elektronen zwischen den aufgespaltenen d Orbitalen angeregt werden, die energetisch recht nahe - verglichen mit den Nicht-Übergangsmetallionen - zusammenliegen. Sogar die Absorption des sichtbaren Lichts reicht zur Anregung aus. Es ist eigentlich unmöglich, die Bildung solcher komplexen Ionen und Verbindungen zu verhindern. Wenn z.B. ein Übergangsmetallsalz in Wasser gelöst wird, entsteht sofort ein ionischer Aquo-Komplex.

Viele Reaktionen sind Oberflächen-katalysiert. Bei zahlreichen industriellen Verfahren wird diese Tatsache ausgenutzt. Enzyme können viele chemische Reaktionen bei Raumtemperatur und in nahezu neutralem Milieu mit großer Geschwindigkeit ablaufen lassen. Ihre hohe Spezifität und Wirksamkeit übertrifft

bei weitem diejenige, die man mit chemischen Systemen außerhalb des lebenden Organismus erhält.

Ein Enzym ist normalerweise ein komplex aufgebautes Protein; es hat eine ungleichmäßige und im chemischen Sinne uneinheitliche Oberfläche, aus der an verschiedenen Stellen verschiedene funktionelle Gruppen herausragen. Nur an bestimmten Stellen, den aktiven Zentren, laufen katalytische Reaktionen ab. Dabei erfolgt stets nur eine bestimmte Reaktion, an der oft nur ein einziges oder zwei spezifisch reagierende Moleküle beteiligt sind.

Da Übergangsmetalle die Eigenschaft besitzen, verschiedene stabile Oxidationsstufen zu bilden, und da sie größere Änderungen ihrer Koordinationssphäre vertragen, eignen sie sich besonders für katalytische Aufgaben. Sie bilden in Proteinen feste koordinative Bindungen und sind daher die aktiven Zentren von Metallenzymen. Das erklärt, warum diese Elemente trotz ihrer teilweise äußerst geringen Konzentration im Organismus eine so enorme Wirkung ausüben.

Die Verbrennung in der Zelle ist ein mehrstufiger Prozeß, bei dem Elektronen über eine Potentialstufenleiter zum Sauerstoffmolekül gelangen (8). Demzufolge sind mehrere Redoxsysteme an der biologischen Oxidation beteiligt. Da nur die Übergangsmetalle in verschiedenen Oxidationsstufen stabil sind, eignen diese sich besonders für die Redoxeinzelschritte. Durch die feste koordinative Bindung der Übergangsmetalle in den Proteinen lassen die Metalle ihre Redoxeigenschaften durch die Liganden-Atome steuern. Elektronengebende Liganden stabilisieren die niedrige Oxidationsstufe des Metalls, erhöhen deren Redoxpotential und machen dadurch das Metallenzym zu einem Oxidationsmittel. Elektronenziehende Liganden stabilisieren die höhere Oxidationsstufe und erniedrigen das Redoxpotential. Andererseits kann die bevorzugte Kordinationsgeometrie eines Übergangsmetalls in zwei Oxidationsstufen verschieden sein. So bevorzugt Kupfer (I) mit vier Liganden die Tetraederkonfiguration, Kupfer (II) aber die planquadratische (vierflächige) Konfiguration. Die Geometrie des Proteinligan-

den kann daher eine Oxidationsstufe begünstigen und auf diese Weise wiederum das Redoxpotential steuern. Umgekehrt kann das Protein dem Kupfer aber auch eine schiefe Geometrie aufzwingen, die zwischen der idealen für Cu (I) und Cu (II) liegt. Dadurch wird nicht nur das Redoxpotential beeinflußt, sondern auch der Übergang von Cu (I) zu Cu (II) kinetisch erleichtert, d.h. das System zum optimalen Redox-Protein "zurechtgebogen". Diese Wechselwirkungen zwischen Metall und Protein erklären die unterschiedlichen Redoxpotentiale der einzelnen Eisen- und Kupferproteine.

Die Enzyme lassen sich in zwei Gruppen einteilen: eigentliche Metallenzyme und metallaktivierte Enzyme (3). Dieser Unterschied ist eher quantitativer als qualitativer Natur, wobei kontinuierliche Übergänge hinsichtlich der Art der Bindung zwischen Metallion und Protein existieren. Bei den eigentlichen Metallenzymen sind die Metallionen fest an bestimmten Stellen des Enzymproteins gebunden, so daß jedes Enzymmolekül eine bestimmte Anzahl von Metallionen besitzt, die nur mit gleichzeitigem Verlust der katalytischen Aktivität des Enzyms entfernt werden können. Unter günstigen Umständen kann die Aktivität des Apoenzyms durch Zufügung des ursprünglichen Metallions wiederhergestellt werden. Metallenzyme enthalten häufig Metalle, die die stabilsten Chelate bilden, insbesondere Fe (II), Cu (II), Zn und Mn (II). Für bestimmte Reaktionen werden spezifische Metalle benutzt, so Cu bei Oxidasen, Zn bei mehreren Dehydrogenasen und Hydrolasen sowie Eisen-Protoporphyrin bei einer Reihe elektronenübertragender Enzyme und Oxigenasen.

Bei den metallaktivierten Enzymen ist das Metall nur lokker an das Protein gebunden und kann bei der chemischen Reindarstellung vom Protein abgetrennt werden, ohne daß das metallfreie Protein seine Aktivität vollständig verliert. Diese weniger enge Bindung läßt vermuten, daß die Beteiligung des Metallions für die Aktivität des Enzymproteins von geringerer Bedeutung ist. Dagegen weisen auch Enzymproteine dieses Typs eine hohe Spezifität für das betreffende Metallion auf. Zu den

Metallen, die Enzyme aktivieren, gehören die Spurenelemente Fe, Cu, Zn, Mn, Mo und Co sowie die Erdalkalimetalle Mg und Ca und die Alkalimetalle Na und K. Einige dieser metallaktivierten Enzyme lassen sich durch mehrere, verschiedene Metallionen, die bestimmte Voraussetzungen hinsichtlich ihres Radius und anderer stereochemischer Bindungen erfüllen müssen, aktivieren. Unter diesen Umständen ist es oft zweifelhaft, welches spezifische Metallion das Molekül unter physiologischen Umständen aktiviert. Die Metallionen mit der stärksten Wirkung müssen nicht zwangsläufig auch die Ionen sein, die das Enzym in der Zelle tatsächlich aktivieren. Der Stabilitätskonstantenbereich von 10^7-10^8 M^{-1} wird als operationale Grenze zwischen den beiden Enzymgruppen vorgeschlagen (9).

Ferner können Metallatome auch in andere Biomoleküle eingebaut sein, die keine Proteine sind (z.B. Kobalt im Vitamin B_{12} und Eisen im Porphyringerüst); diese Moleküle fungieren aber als Coenzyme.

Bei einigen Metallionen hat die Bindung des Metallions einen Einfluß auf den Ladungscharakter und die Konformation des aktiven Zentrums. Der stabilste Komplex von Metall und Protein ergibt sich aus einem Kompromiß zwischen den günstigen Struktur- und Bindungseigenschaften von Metall und Protein. Das daraus resultierende Metallprotein kann unter innerer Spannung stehen und infolgedessen reaktionsfähiger sein. Bei Metallenzymen, die Cu, Fe oder Mn enthalten, erleichtert dieser aktivierte Zustand unter Umständen den Wechsel des Oxidationszustandes des Metallions (z.B. Kupfer). Sowohl bei den Metallenzymen als auch bei den metallaktivierten Enzymen kann das Metallion ferner dazu dienen, die Geometrie des aktiven Zentrums so zu "verschlüsseln", daß nur ganz bestimmte Substrate gebunden werden können (Abb. 4a und 4b: Aufrechterhaltung der Tertiär- und Quartärstruktur des Enzyms). So kann das Metall dazu dienen, bestimmte Stellen der Polipeptidkette in die richtige Anordnung zu bringen oder verschiedene Untereinheiten eines Enzyms zusammenzuhalten. In diesen Fällen führt die Abspaltung des Metallions zur Denaturierung des

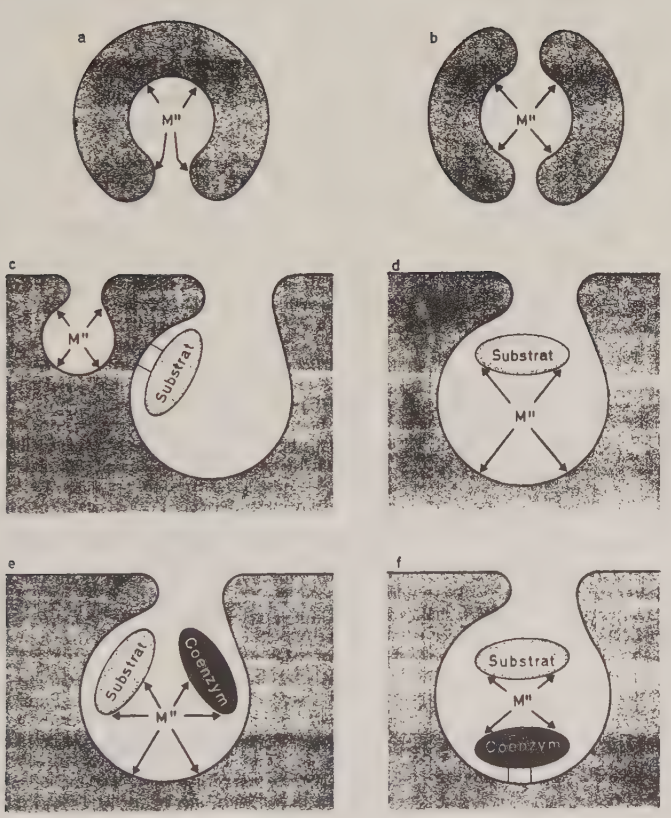

Abb. 4

Unterschiedliche Funktionen von Metallionen im Enzymmolekül (nach Frieden, 1974) (3)

des Enzyms bzw. zu seinem Zerfall in Untereinheiten, woraus in beiden Fällen ein Verlust der enzymatischen Aktivität resultieren kann. Ein Beispiel für diesen Typ sind die Zink enthaltenden Dehydrogenasen, bei denen das Metallion sowohl eine katalytische als auch strukturelle Funktion besitzt.

Ein weiteres Beispiel einer primär strukturellen Wirkungsweise ergibt sich, wenn das Metallion an einem allosterischen Ort gebunden ist (Abb. 4c): Trotz der Entfernung vom aktiven Zentrum kann das Metallion die Substratbindung oder die Reaktionsfähigkeit durch eine Verlagerung von Elektronen oder strukturelle Änderungen des aktiven Zentrums beeinflussen. Nach der Vorstellung der Brückentheorie (Abb. 4d) fördert das Metall die Katalyse dadurch, daß es in der Art einer Brücke die Verbindung zwischen dem Substrat und dem aktiven Zentrum herstellt (z.B. die Aktivierung der Hydrolase Arginase durch Mn (II) und anderer zweiwertiger Metallionen).

Bei der Beteiligung eines Coenzyms an der Katalyse kann das Metallion sowohl das Substrat als auch das Coenzym am aktiven Zentrum binden (Abb. 4e und 4f). Die Coenzyme Pyridoxalphosphat, Flavinadenindinukleotid, Thiaminpyrophosphat u.a. enthalten häufig ein Metallion, das Substrat, Coenzym und Protein zusammenhält (Abb. 4e). Es kann jedoch auch als Brücke den Enzym-Substrat-Komplex an das Coenzym binden oder (wahrscheinlicher) das Substrat an einem Coenzym-Protein-Komplex (Abb. 4f).

Es muß auch erwähnt werden, daß viele Enzyme einen multiplen Metallionbedarf zeigen, was eine auch vielfältige Beteiligung von verschiedenen Typen von Brückenkomplexen im katalytischen Mechanismus andeutet (z.B. der dreifache Metallionbedarf des Acetyl-CoA Synthetase).

Man kann also erwarten, daß Übergangsmetalle als ortgebundene Elektronspender und Rezeptoren den Energiefluß innerhalb von Enzymketten und durch Membranstrukturen dirigieren.

2.4. Spurenelemente in der Umwelt und in den Lebensprozessen

Da immer noch das klassische Mißverständnis besteht, daß die organische Chemie die belebte und die anorganische die unbelebte Natur beschreibt, gilt weithin der Begriff "Anorganische Chemie" als ein Widerspruch in sich (8). Erst seit etwa 10 Jahren wächst das Interesse an der biologischen Wirksamkeit der Metalle, und zahlreiche neue biochemische Untersuchungen zeigten, daß Metalle vielfältige Funktionen im Organismus ausüben und daß die Chemie des Lebens in bedeutendem Maße auch anorganische Chemie ist. Nachgewiesen als lebensnotwendig in verschiedenen Organismen sind mindestens 15 Metalle und 12 Nichtmetalle: Da Metalle die weitaus meisten Elemente in der Natur sind, beteiligen sich an Lebensprozessen mehr Metalle als Nichtmetalle.

Verfügbarkeit und Verwendbarkeit bestimmen das Vorkommen und die Wirkungsweise der Metalle im menschlichen Körper. Etwa 3% des menschlichen Körpergewichtes sind Metalle, und wiederum mehr als 99% davon sind die in beliebiger Menge verfügbaren Hauptgruppenmetalle. Zum Beispiel unterscheiden sich die Konzentrationen von Co und Ca um den Faktor 10^6. Die geringe Quantität der Übergangsmetalle ist jedoch kaum als Maß für ihre biologische Bedeutung zu bewerten, da kein Leben ohne ihre Wirkung stattfinden kann.

Alle Elemente der ersten Übergangsreihe von V bis Zn spielen nach heutigen Kenntnissen eine Rolle in den biologischen Systemen. Cr und Ni sind relativ seltene Elemente aus dieser Reihe, deren Funktionen noch immer weitgehend unbekannt sind. Elemente mit höherer Ordnungszahl als Zink besitzen mit Ausnahme von Se, I und Mo kaum biologische Funktionen. Doch wird immer deutlicher, daß viele dieser schweren Elemente speziell von Mikroorganismen metabolisiert werden.

Einmal in den Organismus eingedrungen finden die lebensnotwendigen Metalle den Weg zum Ort ihres Wirkens, wo sie entweder koordinativ gebunden werden oder als Ionen in Lösungen verfügbar sind. Entsprechend seinen typischen chemischen Merk-

malen wird jedes unerläßliche Metall verwendet. Dabei ist der Unterschied zwischen den Hauptgruppen- (Na, K, Ca, Mg) und den Nebengruppenmetallen (Zn, Cu, Co, Fe, Mn, Mo) deutlich, der zu ganz verschiedenen Funktionen führt.

Die Alkalimetalle haben fast keine, die Erdalkalimetalle nur eine mäßige Neigung zur Ausbildung von Komplexverbindungen. Diese Elemente sind daher in der Zelle und im Blutstrom frei beweglich, und sie werden für die schnellen Prozesse, wie etwa die Nervenleitung und die Muskelkonzentration, dementsprechend gebraucht.

Die "weichen" Übergangsmetalle bilden feste koordinative Bindungen (in Komplexen) mit Schwefel- und Stickstoff-Funktionen der Aminosäuren und ihrer Derivate, und somit werden sie auf den großen, unbeweglichen Proteinmolekülen festgehalten. Sie sind daher, wie schon erwähnt wurde, ortsfest und auf jeweils eine einzige Aufgabe spezialisiert. Gemäß ihrer besonderen Eigenschaft, verschiedene stabile Oxidationsstufen zu bilden und große Variationen ihrer Koordinationssphäre zu vertragen, ist diese Aufgabe wie in der chemischen Technik eine katalytische. Sie sind somit aktive Zentren der vielen Metall-Enzyme, und so kommt es, daß sie trotz ihrer geringen Konzentration im Körper eine so enorme Wirksamkeit ausüben (s. Abschnitt 2.3.).

Man kann zwei große Gruppen von Übergangsmetall-Funktionen unterscheiden; Das sind einmal die Redox-Reaktionen (z.B. bei Eisen-, Kupfer- und Molybdänproteinen) und zum anderen die Reaktionen, bei denen das Metall selbst in einen Reaktionsmechanismus eingreift (z.B. nach Art einer sauren Katalyse wie bei Zn und Co). Eine weitere Funktion beruht auf der Fähigkeit der Metalle, Strukturen organischer Moleküle zu fixieren; in diesen Fällen sind sie also nicht an einem biochemischen Vorgang beteiligt, sondern sie bestimmen einen struktur-chemischen Zustand. Als Beispiel sind Wirkungen von Ca und Mg auf Lipoprotein-Membranen in Zellwänden, ferner von Zn auf Insulin zu nennen.

Hingegen sind für manche wirksamen Spurenelemente über-

haupt keine günstigen, sondern nur ungünstige Wirkungen bekannt; sie sind also nicht essentiell und offenbar keine Bestandteile von normalen Körperstoffen. Sie gelangen nicht nur in der sich entfaltenden industriellen Zivilisation bei mannigfachen Prozessen der Produktion und des Verkehrs in die Umwelt, sondern sie verbreiten sich auch großräumig, ja unter Umständen sogar weltweit (z.B. Cd, Hg und Pb).

Die wachsende Besorgnis um die menschliche Umwelt hat auch das Interesse am Kreislauf von biologisch wirksamen Stoffen in der Natur in starkem Maße gefördert. Das Gleichgewicht von natürlichen Kreisläufen von Schwerelementen wie z.B. Hg, Pb, As und Sn wird immer stärker durch die industriellen Aktivitäten des Menschen gestört, und die Zunahme der Freisetzungsgeschwindigkeit ihrer giftigen Verbindungen im Vergleich zu der Abbau- bzw. Beseitigungsgeschwindigkeit stellt eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit dar. Ferner gibt es Indizien dafür, daß natürliche Kreisläufe von Se, S, Te sowie von Pd, Tl, Cd, Pt, Au und Cr nicht ausgeschlossen sind.

Im Laufe ihrer Evolution haben biologische Systeme diejenigen Elemente für ihre Zwecke ausgewählt, die besonders häufig in der Erdrinde vorkommen; dabei spielte ebenfalls die chemische Verfügbarkeit eine wichtige Rolle. Bei Mikroorganismen nimmt man an, daß die Biotransformation schwerer Elemente ein Schutzmechanismus gegen ihre potentielle Giftwirkung ist (10). Bei der Metabolisierung entsteht gewöhnlich ein Produkt, das leicht aus der Zelle ausgeschieden und dann allerdings selbst noch giftiger für höhere Organismen werden kann. Das führte zur Einteilung der Elemente in diejenigen, die für biologische Systeme notwendig sind und in höheren Konzentrationen giftig werden (sog. essentielle Spurenelemente) und diejenigen, die von vornherein mit steigender Konzentration immer giftiger werden (Abb. 5).

Voraussetzung für die Wirkung des Spurenelements ist in der Regel sein Eintritt in das Innere der Zelle, wo die Lebensvorgänge stattfinden, und dafür ist wieder Vorbedingung, daß das Element überhaupt in den Gesamtorganismus aufgenommen wird.

Die Aufnahme erfolgt bei der Pflanze aus Boden, Dünger, Wasser und Luft; bei Tier und Mensch meist durch Nahrung, Wasser und Luft, seltener aufgrund von Berührung durch die Haut. Hier findet man nun das schwächste Kettenglied in der Erforschung der Spurenelementwirkung: den Weg, auf dem die Spurenelemente ins Innere der Zelle gelangen. Dies gilt besonders für den höheren tierischen und den menschlichen Organismus.

Vermutlich werden jene Elemente besonders stark auf zelluläre Prozesse wirken, für die Mechanismen der Aufnahme bestehen. Das sind unter den toxischen Elementen jene, die von der Zelle mit essentiellen Elementen verwechselt werden, wie z.B. Cd und Tl. Dies ist offenbar einer der Gründe,deretwegen diese Elemente noch giftiger sind als etwa Blei.

Bei der Betrachtung der Nahrungskette steht fest, daß die Konzentrationsfähigkeit der Organismen oft enorm ist und daß z.B. im Phyto- und Zooplankton gegenüber dem Wasser leicht tausend- und zehntausendfache Bruttoanreicherungen erreicht werden. So werden diese oft gefährlichen Stoffe durch die Lebewesen gewissermaßen aus dem Wasser abgeschöpft und in die Nahrungskette eingebracht. Eine ähnliche Konzentrationsfähigkeit wie bei Mikroorganismen des Wassers besteht auch bei Organen von Landpflanzen, besonders bei Wurzeln.

Der ständig zunehmende Verbrauch von Schwermetallverbindungen in Industrie und Landwirtschaft führt zu einer immer größeren Belastung der Umwelt mit anorganischen Schadstoffen, über deren Verbleib und Wirkungsweise auf den menschlichen Organismus vielfach noch keine klaren Vorstellungen herrschen.

Bereits der menschliche Keim ist im mütterlichen Körper den verschiedensten Einflüssen direkt oder indirekt unterworfen (11). Die schädigende Wirkung vieler endogener und exogener Faktoren auf die Keimentwicklung zeigt sich unter anderem in der Zahl der mit Fehlbildungen zur Welt kommenden Kinder (1-2% aller lebendgeborenen Kinder haben bei der Geburt sichtbare Anomalien). Diese Zahl erhöht sich noch wesentlich, wenn auch die Tot- und Fehlgeburten sowie die durch Resorption endenden Schwangerschaften mit berücksichtigt werden.

Hoch ist auch die intrauterine Sterblichkeit, besonders in den ersten Stadien der Entwicklung (25-30% aller angelegten Keime sterben ab, ohne daß eine beginnende Schwangerschaft überhaupt erkannt wird). Berücksichtigt man noch die spontanen und artifiziellen Aborte, die Zahl der Totgeburten und die perinatale Sterblichkeit, so erreichen nach Schätzungen nur etwa 45% der Zygoten das fortpflanzungsfähige Alter.

Eine intensive und weltweite Forschung auf dem Gebiet der Teratologie gibt es erst seit 30 Jahren, da sie eine Kenntnis der normalen Keimesentwicklung voraussetzt. Weil eine normale Entwicklung nicht exakt definiert werden kann, ist auch eine exakte Abgrenzung der Fehlbildungen nicht möglich. Das erschwert die Erfassung der Befunde und die Angaben über deren Häufigkeit.

Verursacht werden Entwicklungsstörungen des Keimes durch endogene und exogene Faktoren. Beide Faktoren können von einander unabhängig wirksam werden. Recht oft kommt es aber sicher auch zu vielfältigen Wechselwirkungen zwischen genetischen und peristaltischen Gegebenheiten. Die Mehrzahl der bei der Geburt sichtbaren Schädigungen sind sicher multifaktoriell bedingt.

Vielfältiger noch als die genetischen Faktoren sind die exogen auf die menschliche Leibesfrucht einwirkende Noxen. Da der Nachweis einer Keimschädigung durch exogene Faktoren schwer zu führen ist, werden immer wieder neue Noxen, besonders Arzneimittel sowie Pestizide, Herbizide und Schwermetallverbindungen als teratogenen verdächtigt. Einen ursächlichen Zusammenhang zwischen der exogenen Noxe und der entstandenen Fehlbildung hier aufzuzeigen, ist unmöglich; aber sicher ist, daß die Schädigungsmöglichkeiten des Fetus während der Schwangerschaft vielfältig sind.

Bei den chemischen teratogenen Substanzen handelt es sich zuletzt nicht nur um körperfremde Stoffe; eine ungenügende bzw. überhöhte Zufuhr bestimmter Bestandteile der Nahrung (Vitamine, Spurenelemente) können u.a. bei dem sehr aktiven Bau- und Betriebsstoffwechsel eines heranwachsenden Keims Fehlbildungen

auslösen.

Die Zahl der im Tierversuch als teratogen erkannten Chemikalien steigt ständig. In den letzten Jahren sind viele chemische Substanzen in den mütterlichen Organismus und durch die Plazenta in die Leibesfrucht gelangt und somit als keimschädigend verdächtigt worden. Die Pharmakogenetik bzw. Chemogenetik versucht u.a. durch Tierversuche, Gefahren durch derartige Substanzen rechtzeitig zu erkennen und vor ihrer Verabfolgung, besonders während der Schwangerschaft, soweit wie möglich zu warnen.

In der heutigen Welt, wo Überbevölkerung und Industrialisierung in schnellem Tempo fortschreiten, bedrohen vielerlei verschiedene Faktoren die Lebensfähigkeit der Natur und des Menschen. Was die Umwelt für den einzelnen Menschen und für die Menscheit im ganzen bedeutet, wurde erst klar als die fortschreitende Industrialisierung, die Vergiftung und Verunreinigung von Lebensmitteln, Boden, Wasser und Luft in solchem Maße zunahm, daß sich heute die regionale Umweltbelastung mit Schwermetallen sogar in der menschlichen Plazente widerspiegelt (Thieme u. Mitarb.). Unseren jetzigen Kenntnissen gemäß scheinen die in den Nahrungsketten sich anreichernden, schwer zerfallenden Gifte den Fortbestand des Lebens, gerade wo es beginnt, am unmittelbarsten zu bedrohen: in der mütterlichen Leibesfrucht!

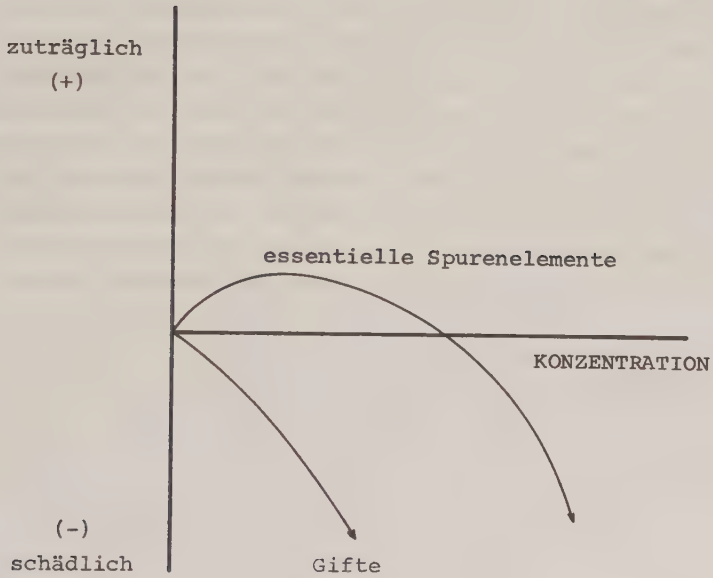

Abb. 5

Physiologische Wirkung von Spurenelementen

3. Vorbereitung der Proben und Anwendung eines verbesserten Aufschlußverfahrens

Körperflüssigkeiten und Körperzellen unterscheiden sich erheblich bezüglich ihres Gehaltes an den einzelnen Mineralstoffen (12). Man findet in den Organen und Geweben häufig große Differenzen, mitunter schon an verschiedenen Stellen desselben Organs bei ein und demselben Individuum. Bei der Beurteilung von Mineralanalysen muß berücksichtigt werden, daß nicht nur die Organzellen zur Analyse gelangen. Man untersucht im allgemeinen ein Gemisch von Zellen, Stützsubstanzen, Interzellularflüssigkeit und Blut. Es ist auch von ausschlaggebender Wichtigkeit, möglichst lebensfrisches Material zu verarbeiten. Es ist nicht empfehlenswert, auf die Feststellung des Frischgewichtes zu verzichten und die ermittelten Werte nur auf das Trockengewicht zu beziehen. Muß Material längere Zeit hindurch aufgehoben werden, so ist es zweckmäßig, dasselbe nach Bestimmung des Wassergehaltes zu trocknen und das Trokkenpulver im Exsikkator aufzubewahren. Mitunter ist es vorzuziehen, die gesamte Substanz sofort aufzuschließen und die zu einem bekannten Volumen aufgefüllte Aufschlußlösung aufzuheben.

Es ist selbstverständlich, daß die Analysenproben einwandfrei gewonnen werden müssen. Etwa anhaftendes Begleitmaterial und Blut sind vorsichtig zu entfernen. Größere Organstücke müssen zerkleinert werden, und dabei muß man sich davon überzeugen, daß durch die Vorbehandlung nicht die Elemente eingeschleppt werden, auf die man untersuchen will.

In vielen Fällen ist die Verteilung einzelner chemischer Bestandteile, auch in homogenen Geweben nicht gleichmäßig. Man verwendet deshalb zur Analyse am besten einen aliquoten Teil eines größeren, möglichst fein zerkleinerten und getrockneten Gewebestückes. Für die meisten Untersuchungen erweist sich die Zerkleinerung in einem sog. "Fleischwolf" mit nachfolgender Trocknung im Trockenschrank und Verreibung im Mörser als ausreichend.

Unerläßlich sind sauberes Arbeiten, reine Gefäße und einwandfreie Chemikalien. Zur Kontrolle sollen daher bei jeder Analysenserie auch Blindbestimmungen mitlaufen.

Da bei der Bestimmung der anorganischen Bestandteile des Gewebes der Blutgehalt der Plazenta stört, haben die früheren Untersucher das Plazentagewebe "blutfrei" gespült. Nach Mischel (13) entstehen bei dieser Art der Gewebevorbereitung drei schwere Fehler:

1. Durch die Spülung des Gewebes gehen leicht lösliche Anteile der Plazenta verloren: Die Gewebeverluste betragen mindestens 7%.
2. Die Gefäße und das Gewebe nehmen bei der Spülung Flüssigkeit auf: Der Gewichtszuwachs macht bis zu 47% aus.
3. Mit der Flüssigkeit werden, wenn man mit physiologischer Kochsalzlösung spült, reichlich Fremdionen in das Gewebe gebracht. Der hierdurch bedingte Fehler beträgt bei Mineralanalysen bis zu 30%.

Außerdem wird selbst bei langdauernder Spülung das Plazentagewebe nie ganz blutfrei. Somit muß die Trockensubstanz des bluthaltigen Plazentagewebes bestimmt werden. Mischel bestimmte in 564 Einzelbestimmungen in 146 normalen und pathologischen menschlichen Plazenten den Gesamt- und Gewebseisengehalt colorimetrisch mit o-Phenanthrolin. Es ergab sich für den Wassergehalt der normalen bluthaltigen Plazenta - also für den Wassergehalt des Plazentagewebes und des Blutes - im Mittel 82,86%. Bringt man den Wasseranteil des Blutes in Abzug, so liegt der Wassergehalt des eigentlichen Plazentagewebes bei 83,25%. Folglich ist die Trockensubstanz der normalen, reifen, bluthaltigen Plazenta sehr niedrig: Sie beträgt im Mittel nur 17,14%.

Bei der Spurenanalyse sind die Fehlerquellen vielschichtig und verteilen sich jeweils über das gesamte Analysenverfahren, von der Probennahme bis zur Auswertung der Analysedaten (14). Da bei der Probenvorbereitung sehr viele Fehlermöglichkeiten auftreten können, sollte man stets folgende Effekte

beachten:

a) Substanzverlust durch Verflüchtigung und Adsorptionseffekte;
b) Blindwerteinschleppungen durch Reagenzien, durch Desorption und Anlösen der Gefäßwände, durch Gegenstände und aus der Luft (Staub).

Die Größe der Effekte hängt aber nun weitgehend von dem gewählten Aufschlußverfahren ab.

Damit der Gehalt der Spurenelemente in biologischen Materialien mit der Spektralphotometrie und der Atomabsorptionsspektralphotometrie bestimmt werden kann, müssen die Proben fast immer aufgeschlossen werden, d.h. auf irgendeine Weise in eine möglichst homogene flüssige Form gebracht werden. Entsprechend der Mannigfaltigkeit des Probenmaterials ist auch die Zahl der Aufschlußverfahren sehr groß. Man kann sie grob in vier Gruppen einteilen (15):

1. Trockene Veraschungsverfahren ($t < 300\ ^{o}C$);
2. Nasse Aufschlüsse in mehr oder weniger abgeschlossenen Systeme;
3. Aufschlüsse in geschlossenen Druckbomben;
4. Veraschung der Proben im Hochfrequenzfeld durch aktivierte Gase (meistens Sauerstoff).

Welche Aufschlußmethode bei der Untersuchung eines bestimmten Probenmaterials angewendet wird, ist erstens eine Frage des Materials, zweitens eine der zur Verfügung stehenden Zeit und drittens und nicht zuletzt auch eine Frage der verfügbaren Geldmittel.

Im Laufe der letzten Jahre sind verschiedene Verfahren zur kalten und trockenen Veraschung kleiner Probenmengen entwickelt worden. Das überwiegende Veraschungsprinzip ist die Oxydation in angeregtem Sauerstoff. Zwar kennen Verfahren der vierten Gruppe u.U. keine Blindwertprobleme; sie kosten aber relativ viel Zeit, und die benötigten Apparaturen sind verhältnismäßig kostspielig.

Aufschlüsse nach Verfahren der dritten Gruppe dauern 1 - 3 Stunden; sie sind also ziemlich schnell, aber die Druck-

bomben und die Teflonauskleidung, die von Zeit zu Zeit ersetzt werden müssen, erfordern einige Investitionen. Außerdem können jeweils nur kleine Proben aufgeschlossen werden.

Bei den trockenen Veraschungsverfahren hat man meist nur geringe Blindwertprobleme und Kosten; sie benötigen aber viel Zeit, und leider muß man bei ihnen damit rechnen, daß bei der Veraschung ein Teil der leichter flüchtigen Elemente wie Cd, Zn, As, Se, Hg und derjenigen, die leicht flüchtige Halogen- bzw. Carbonylverbindungen bilden (z.B. Sn, Sb, Au, Ni), verlorengehen, also auf diese Weise nicht nachgewiesen werden können.

Verfahren der zweiten Gruppe haben meist Blindwertprobleme, oder aber die eigentliche Analyse mit der AAS wird durch noch in der Aufschlußlösung befindliche organische Restverbindungen, die vor allem zur unspezifischen Absorption beitragen, gestört. Auch können hierbei die Aufschlußreagentien erheblich stören, beispielsweise durch hohe Rauchsignale (z.B. Schwefelsäure).

Im idealen Falle sollen die Aufschluß- und Veraschungsmethoden von biologischem Material zur Analyse geringer anorganischer Spurengehalte erstens für relativ große Substanzmengen geeignet sein, zweitens Spurenverluste verhindern oder zumindest genau kontrollieren, drittens keine Spurenverunreinigungen einschleppen, viertens Serienbetrieb bei nur geringer Aufsicht ermöglichen und fünftens schnell und einfach sein.

Die Vorteile von Naßveraschungsmethoden gegenüber der Trockenveraschung liegen hauptsächlich in der schnelleren und oft vollständigeren Veraschung sowie den bei der niedrigeren Arbeitstemperatur geringeren Spurenverluste durch Verflüchtigung oder Einbrennen in das Gefäßmaterial.

Die nasse Zerstörung biologischer Materialien mit Schwefelsäure, Perchlorsäure und Salpetersäure stellt eine sehr wirksame Art der Veraschung dar, aber es ist unerläßlich, die Arbeitsvorschriften genau einzuhalten, da sonst die Gefahr heftiger Explosionen besteht. Die Reaktion läßt sich jedoch leicht beherrschen,und mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich

große Mengen organischer Substanz innerhalb kurzer Zeit zerstören. Zur Veraschung von 20 g Trockensubstanz (etwa 120 g Organ) benötigt man nur etwa 1,5 Std.. Der besondere Vorteil ist aber, daß diese Veraschungsmethode keine oder sehr geringe Investition verlangt. Der Nachteil, wie gesagt, besteht darin, daß die Aufschlußlösung eine relativ große Menge Säure enthält.

Wir haben mit einem modifizierten Verfahren der nassen Veraschung mit Schwefelsäure, Perchlorsäure und Salpetersäure verschiedene Spurenelemente der Humanplazenta durch Spektralphotometrie und AAS zuverlässig bestimmen können. Ein Verlust von Spurenelementen infolge Verflüchtigung wurde auf eine einfache Weise weitgehend verhindert. Außerdem wurde der unangenehme Umgang mit den bei nasser Veraschung entstehenden giftigen Dämpfen vermieden.

Arbeitsvorschrift

Probennahme: Die frischgeborenen reifen normalen Plazenten wurden in Plastikbeuteln aufgehoben und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

Probenvorbereitung: Hier wurden die Richtlinien von Mischel (16) mit berücksichtigt. Die eingefroren gelagerten normalen, reifen Humanplazenten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach sorgfältiger Entfernung des überschüssigen Materials wurde das gesamte Plazentagewebe im Fleischwolf zerkleinert. Das überschüssige Blut wurde angemessen dekantiert, und das bluthaltige Plazentamaterial wurde dann bei -20°C wiederum eingefroren. Danach wurde im Gefriertrockner 24 Std. lyophylisiert und 48 Std. im Trockenschrank auf 17,35% des Frischgewichtes getrocknet. Das im Achatmörser gepulverte Trockenmaterial wurde bis zur weiteren Bearbeitung im Exsikkator aufbewahrt.

Aufschlußverfahren: Zur Veraschung des Trockenmaterials wurde das Verfahren von Bock und Gorbach (17) verändert und verbessert. Zunächst wurden 20 g des getrockneten Plazentamaterials in einem 500 ml-Rundkolben, der zu einer modifizierten Auf-

schlußapparatur gehört (s. Abb. 6), überführt und mit 30 ml konz. H_2SO_4 versetzt. Die Reaktionsmischung wurde am Rückfluß erwärmt ($t \leq 100^{\circ}C$) und 65%ige HNO_3 mittels der oben im Kühler eingebauten Bürette bei etwa 160° eingetropft. Sobald sich in der Mischung keine festen Teilchen mehr befanden, wurde durch die andere Bürette vorsichtig 70%ige $HClO_4$ hinzugegeben ($t < 205^{\circ}C$), bis die Mischung durchsichtig aussah. Nachdem einige Zeit auf $170^{\circ}C$ erwärmt worden war, wurde abgekühlt und nach Abziehen überschüssiger Säure im Vakuum bis auf ein Restvolumen von ca. 30 ml mit 2 g Trinatriumzitrat-2-hydrat versetzt, um Niederschlagsbildung zu verhindern, und anschließend mit demineralisiertem, destilliertem Wasser zu einem Liter Stammlösung aufgefüllt.

Anmerkungen

Mit der eben beschriebenen Prozedur haben wir Humanplazenten aus dem Raum West-Berlin in einer Weise aufgearbeitet und in Stammlösungen überführt, daß wir statistisch gesicherte Mittelwerte für die verschiedenen Spurenelement-Bestimmungen haben gewinnen können:

a) die gesamte einzelne Plazenta ist aufgearbeitet worden, und
b) eine Anzahl von 20 verschiedenen Humanplazenten sind untersucht worden .

Die für die Probenvorbereitung verwendeten Chemikalien sind von hoher Reinheit (Suprapur und zur Analyse). Die Aufschlußapparatur (Jenaer Glas) wurde durch Vorversuche mit dem Säuregemisch gereinigt und nach jedem Aufschluß mit einer HNO_3-Lösung sorgfältig gewaschen. Zum Nachwaschen wurde demineralisiertes, destilliertes Wasser benutzt. Alle für die Aufschlußmethode verwendeten Poliäthylen- und Glasmaterialien wurden ebenfalls vorher mit HNO_3-Lösung gereinigt und mit demineralisiertem, destilliertem Wasser nachgespült. Die Plazenta-Stammlösungen wurden in klare 1000 ml-Poliäthylenflaschen überführt und in einem gut geschlossenen Schrank während der Arbeitsperiode aufbewahrt.

Die verwendeten Apparate:

- Trockenschrank Heraeus Typ RV / 220
- Gefriertrockner Leybold-Heraeus GT 2

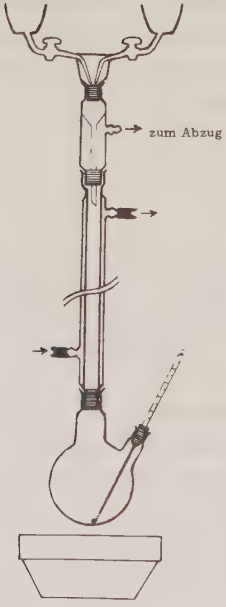

Abb. 6

Aufschlußapparatur

4. Spektralphotometrische Bestimmung von Spurenelementen der menschlichen Plazenta

In den meisten klinisch-chemischen Laboratorien werden heutzutage infolge des apparativen Aufwandes immer noch die spektralphotometrischen Methoden bevorzugt, obwohl andere Methoden, insbesondere die Atomabsorptionspektroskopie eine stetig steigende Anwendung findet. Etwa 75% aller klinisch-chemischen Bestimmungen sind noch durch spektralphotometrische Methoden durchgeführt. Hieraus ergab sich die Forderung nach besseren spektralphotometrischen Methoden zur einwandfreien Bestimmung von Spurenelementen in biologischem Material.

Spektralphotometrische Analysenverfahren können in einem weiten Arbeitsbereich angewendet werden. Unter geeigneten Bedingungen sind Bestimmungen von ppm- bis ppb-Bereich mit relativ kleinen Fehlern möglich. Die Spektralphotometrie in Lösungen ist eine der leistungsfähigsten instrumentellen Methoden der analytischen Chemie mit relativ geringem Schwierigkeitsgrad und apparativem Aufwand. Entgegen einer vielfach vertretenen Meinung eignet sich die Spektralphotometrie nicht nur zur Spurenanalyse, sondern ist gleichermaßen auch für die Bestimmung von Haupt- und Nebenbestandteilen geeignet. Durch eine Vielzahl selektiv wirkender Farbreagenzien auf organischer Basis, dem gezielten Einsatz von Hilfskomplexbildern und der eventuellen Einbeziehung von Extraktionstrennungen in den Arbeitsgang können sehr gute Selektivitäten erreicht werden.

Die instrumentelle Analytik ist ein moderner Zweig der Analytischen Chemie und Hilfswissenschaft für einen breiten Forschungsbereich. Sie ist aber zu einem Moloch geworden, der die zur Verfügung stehenden Mittel verschlingt. Besonders Großgeräte können aus wirtschaftlichen Gründen nicht mehr einem einzelnen Arbeitskreis allein zur Verfügung gestellt werden. Diese Entwicklung und die entstandenen Bedürfnisse zwingen zu einer Neubesinnung.

In vielen Laboratorien vertritt man die Ansicht, daß die Spektralphotometrie in diesem Zusammenhang mehr Vor- als Nachteile hat und daß spektralphotometrische Analysen mit wesentlich geringerem instrumentellen Aufwand durchgeführt werden können. Ein wichtiger Nachteil der spektralphotometrischen Methoden liegt jedoch darin, daß sie immer nur die Analyse eines einzelnen Elementes ermöglichen.

4.1. Anwendung der spektralphotometrischen Bethocuproinmethode zur Bestimmung des Kupfergehaltes in Humanplazenten

Einleitung

In der letzten Zeit hat sich die Biochemie des Kupfers innerhalb der anorganischen Biochemie rasch entwickelt, da es neben anderen essentiellen Elementen wie Zn, Fe, Mn, Mo, Co, Cr, I, Sn, Se, V u.a. als Spurenelement eine überragende Rolle im Stoffwechsel spielt. Seine biologische Bedeutung liegt im wesentlichen in seiner Beteiligung an Oxydationsvorgängen und an der Reticulocytenbildung. Das Depoteisen des Körpers wird durch Kupfer mobilisiert. Neuerdings richtet sich das Interesse auf die Wechselwirkungen zwischen Kupfer und Molybdän beim Einbau von Kupfer in die Leber. Ein Mangelsymptom durch Kupfer beim Erwachsenen ist bisher nicht bekannt, scheint jedoch in der Ätiologie der klinischen Syndrome des Kindes beteiligt zu sein. Die Funktion verschiedener kupferhaltiger Proteine ist im Detail noch nicht bekannt, obwohl Isolierung und Aufklärung der chemischen Struktur bereits gelungen ist.

Kupferwerte sind von klinischem Interesse, da Abweichungen des Normalkupferspiegels verschiedener Körperflüssigkeiten und Gewebe sich unmittelbar zu einer Differenzialdiagnose heranziehen lassen (18). So finden sich erhöhte Werte für den Kupferspiegel des Serums in der Gravidität, bei Einnahme von Ovulationshemmern, bei Infektionskrankheiten und bei Ikterus. Weiter findet sich eine Erhöhung der Kupferwerte bei malignen Geschwülsten, bei denen die Eisenwerte meist gesenkt sind. Eine Ausnahme bildet das primäre Leberkarzinom, bei dem beide Metalle erhöht sind. Ein gesenkter Kupferspiegel findet sich meist bei Nephritis mit nekrotischem Einschlag, jedoch immer bei der hepatolentikulären Degeneration (Morbus Wilson).

Auch in der Plazenta scheint Kupfer eine bedeutende und vielfältige Funktion zu haben. Kupfer ist aber in der normalen, bluthaltigen Humanplazenta nur einmal bestimmt worden (19).

De Jorge et al. (20) untersuchten das Fruchtwasser, die Plazenta und das maternale bzw. fetale Blut hinsichtlich des Kupfergehaltes und der Kupferoxydaseaktivität. Ferner sind nur allgemeine Mitteilungen (21-24) über die Spurenelement-Zusammensetzung der Plazenta in der Literatur zu finden.

Alle bekannten spektralphotometrischen Methoden zur Kupferbestimmung in biologischem Material sind mehr oder weniger unspezifisch und von geringer Empfindlichkeit. Deswegen erscheint uns die Anwendung der spezifischen spektralphotometrischen Bathocuproinmethode zur Bestimmung des Kupfergehaltes von Humanplazenten sehr zweckmäßig und vorteilhaft.

Methodik

Zur Kupferbestimmung sind mehr Methoden vorhanden als für jedes andere Element: Wir kennen ca. 100 auf verschiedene Chromogengruppen basierende Methoden. Für die Bestimmung des Kupfergehaltes in biologischem und organischem Material wurden außer Bathocuproin (25-30) angewandt bzw. empfohlen: Bathocuproindisulfonsäure (31, 32), Dithizon (33-36), Natriumdiäthyldithiocarbamat (19, 20, 26, 37-43), Ammoniumdiäthyldithiocarbamat (26), Diathylammoniumdiäthyldithiocarbamat (27, 44-46), Bleidiäthyldithicarbamat (26, 47), Bleidibenzyldithiocarbamat (48), Zinkdibenzyldithiocarbamat (27, 49-52), Neocuproin (33, 46, 52-53), Zincon (54), Bichinolin (39, 52, 56), Bis-Zyklushexanonoxalyldihydrazon (33, 52, 56, 57), Oxalyldihydrazon (58, 59), Diphenylcarbazid (60), Bis-(2,6-dimethyl-morpholin)-thiurandisulfid (61), 3,3'-Dimethylen-2,2'-dicinchoninsäure (18), N,N,N',N'-Tetraäthylthiurandisulfid (62), Katalytische Methode (63), u.a. An dieser Stelle ist selbstverständlich eine detailliertere Diskussion einzelner Methoden nicht möglich.

Bathocuproinmethode: Dithizon ist ein sehr empfindliches Reagenz für Kupfer ($\epsilon_{550\ nm} = 4{,}5 \cdot 10^4$ l.mol.$^{-1}$.cm^{-1} in CCl_4) aber von schlechter Selektivität. Bathocuproin ist dagegen das selektivste Reagenz (spezifisch) und überdies von hoher Emp-

findlichkeit ($\epsilon_{479\ nm} = 1{,}4 \cdot 10^4\ l.mol^{-1}.cm^{-1}$ in n-Hexyl oder Isoamylalkohol) (64). Kupfer bildet besonders stabile und intensiv gefärbte Chelate mit Diaminen (65). Am wichtigsten sind die Cuproingruppen, da sie nur (1:1)-Chelatkationen mit Kupfer (I) geben und die Bildung entsprechender (1:3)-Eisen (II) Chelatkationen sterisch gehindert ist. Die Anwesenheit von Methylgruppen in den Positionen 2,9 des 1,10-Phenanthrolinmoleküls hemmt die Bildung von üblichen Trichelaten (sterischer Effekt) und erhöht die Basizität des Reagenzes (große Stabilitätskonstante des Kupferchelates). Weitere zwei Phenylgruppen in den Positionen 4,7 tragen noch mehr zur Stabilität des Komplexes und dadurch zur Erhöhung der Selektivität (66) bei. Die Rückkoordinierung ist ein sehr wichtiger Stabilitätsfaktor des Kupfer-Bathocuproinchelats: Es wird ein starker tetraedischer Komplex gebildet. Ein ähnlicher Komplex des Eisen (II) ist von "high spin", unstabil und farblos.

Mit Kupfer (I) bildet Bathocuproin rot- bis orangefarbene, im Wasser unlösliche Komplexe, die in organischen Lösungsmitteln als Ionenassoziate mit einwertigen Anionen extrahierbar sind. Eine Untersuchung von 12 verschiedenen spektralphotometrischen Methoden auf ihre Eignung zur Bestimmung von Kupferspuren in organischem Material (27) hat gezeigt, daß Bathocuproin am geeignetsten ist. Nach Martins (30) erweist sich diese Methode als völlig spezifisch zur Kupferbestimmung von Bodenproben.

Arbeitsvorschrift:

Reagenz: 2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin (Bathocuproin) - $C_{26}H_{20}N_2$ (Abb. 3)
Empfindlichkeit: $\epsilon_{460\ nm} = 1{,}2 \cdot 10^4\ l.mol^{-1}.cm^{-1}$ in $CHCl_3$
Relative Standardabweichungen: $V_{2\ \mu g\ Cu} = \pm 1{,}5\%$
Messungen: In 1 cm-Küvetten gegen Chloroform (Blindprobenabsorption ist zu vernachlässigen)
Lösungen: 1. Reagenzlösung: 0,1%ige Bathocuproin-Lösung in Äthanol
2. 10%ige L-Ascorbinsäure-Lösung

3. 40%ige Natriumacetat-Lösung
4. Kupferstammlösung: 1 g Cu . l^{-1} (Titrisol)
5. NaOH-Lösungen (40% und 2 M)

Eichkurve: Durch angemessene Verdünnung der Kupferstammlösung und Zugabe von Trinatriumzitrat-2-hydrat (wie für die Plazenta-Stammlösungen) wurde eine Reihe Kupferlösungen hergestellt und damit eine geradlinige Eichkurve erreicht (Abb. 8). Das Lambert-Beer'sche Gesetz wird im Bereich von 0,05 - 0,50 μg Cu . ml^{-1} erfüllt. Die Ergebnisse der Reihe von vier Bestimmungen jeder Standardlösung zur Aufstellung der Eichkurve sind in Tabelle 1 angegeben.

Untersuchung der Plazenta-Stammlösungen: Genau 75 ml der Plazenta-Stammlösungen wurden in 100 ml-Meßkolben eingefüllt und mit Hilfe der Hydroxidlösungen auf einen neutralen oder schwach sauren pH-Wert eingestellt. Nach Auffüllung zur Marke mit demineralisiertem, destilliertem Wasser wurden je 25 ml (wie zur Aufstellung der Eichkurve) in 100 ml Scheidetrichter einpipettiert und danach 1 ml Ascorbinsäurelösung, 2 ml Acetatlösung und 0,5 ml Bathocuproinlösung hinzugefügt. Nach 1 Minute wurden 5 ml Chloroform hinzugegeben und 1 Minute lang geschüttelt. Die organische Phase wurde abgetrennt und bei 460 nm gemessen.

Kupfergehalt der Plazenta: Die 20 Plazenta-Stammlösungen wurden einzeln in einer Reihe mit je drei Bestimmungen untersucht (Tabelle 6). Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- bzw. Frischmaterial sind in Tabelle 7 angegeben. Zur Überprüfung der Methode wurde eine 50%ige Lösung der Plazenta-Stammlösung E, deren Kupfergehalt bekannt war, benutzt. Aliquote Mengen von Kupferlösungen wurden hinzugefügt und die Wiederfindungsrate ermittelt. Die Ergebnisse gibt Tabelle 8 wieder.

Resultate und Diskussion

Die bisher relativ wenig gebrauchte Bathocuproinmethode

ist zur Kupferbestimmung sehr geeignet. Der Konzentrationsbereich des Kupfers in menschlichen Plazenten ermöglicht eine einfache, rasche Bestimmung mit Hilfe dieses Verfahrens. Die Überprüfung der Methode zeigte ihre hohe Selektivität, Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit. Mehrfache Mengen der in biologischen Materialien enthaltenen Anionen und Kationen interferieren nicht. Auch andere Spurenelemente, die üblicherweise vorkommen, stören nicht. Kobalt, der einzige mögliche Interferent, ist im ppb-Bereich in der Plazenta anwesend: im Falle $C_{Co} \leq C_{Cu}$ ist diese Störmöglichkeit zu vernachlässigen (30). Das Reagenz kann also als spezifisch für Kupfer (I)-Ionen angesehen werden.

Wir haben durch die Anwendung der spezifischen Bathocuproinmethode einen Kupfergehalt von 1,21 $\pm$ 0,18 ppm im Frisch- und 7,06 $\pm$ 1,04 ppm im Trockenmaterial gefunden. In der einzigen bisher bekannten Arbeit (19) über den Kupfergehalt der normalen, reifen, bluthaltigen Humanplazenta sind doppelt so hohe Werte angegeben: 2,45 bzw. 12,4 ppm. Allerdings ist hier eine ältere unspezifische photometrische Bestimmung benutzt worden.

Der Kupfergehalt wird in bluthaltigen Plazenten bestimmt, wie schon gesagt, weil selbst bei langdauernder Spülung das Plazentagewebe nie ganz blutfrei wird und außerdem der hierdurch entstehende Fehler sehr groß wäre. Mischel (67) bestimmte mittels Eisenanalysen den Blutgehalt der Plazenta (im Durchschnitt 12,0%); somit ließe sich der Kupfergehalt des Plazentagewebes aus der Differenz des Gesamt- und Blutkupferanteiles errechnen.

Der Gesamtgehalt einer normalen, reifen, bluthaltigen, menschlichen Plazenta beträgt weniger als 1% des Gesamtkupfervorkommens des Erwachsenenkörpers.

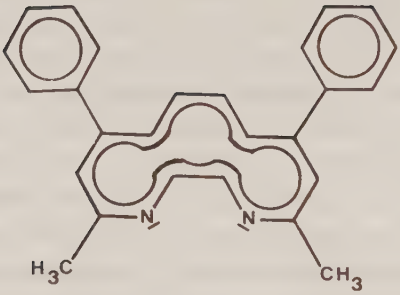

Abb. 7

2,9-Dimethyl-4,7-diphenyl-1,10-phenanthrolin

(Bathocuproin)

Tabelle 5 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der Bathocuproinmethode

Cu-Standard-Lösungen (µg Cu/ml)	Gesamte Menge (µg Cu/25 ml)	Extinktionen				Mittelwerte
0,04	1,0	0,074	0,076	0,078	0,076	0,076
0,12	3,0	0,274*	0,242	0,238	0,245	0,242
0,20	5,0	0,435	0,405	0,415	0,445	0,425
0,28	7,0	0,590	0,580	0,580	0,580	0,580
0,36	9,0	0,790	0,765	0,765	0,790	0,778

* Ausgeschlossen nach dem Q-Test von Dean und Dixon (68).

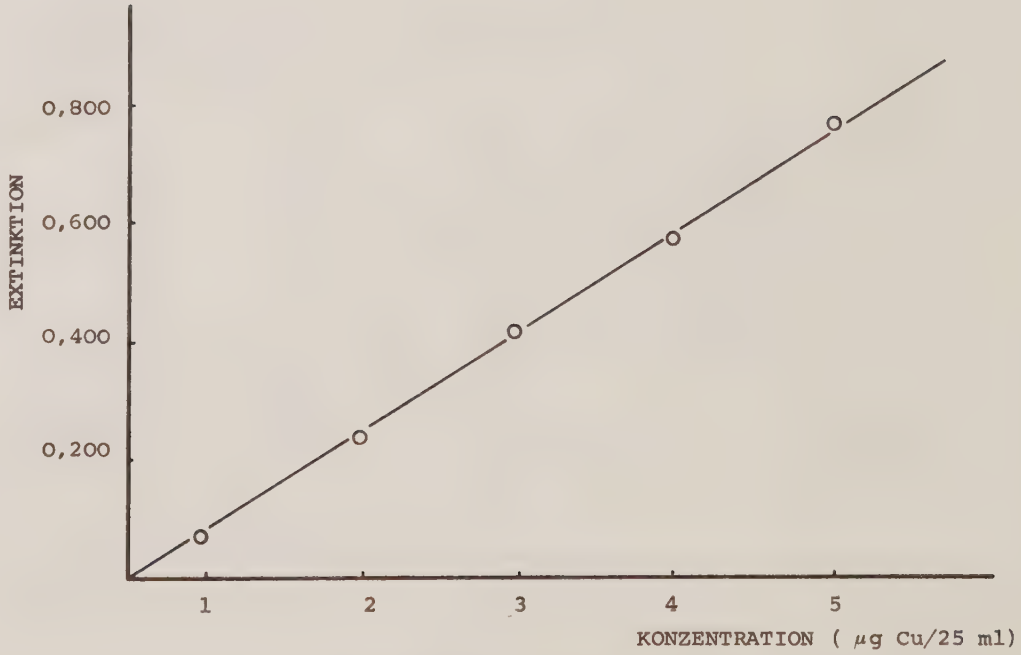

Abb. 8

Eichkurve der Bathocuproinmethode im Bereich von 1 bis 5 µg Cu/25ml bei 460 nm in 1 cm-Küvette

Tabelle 6 Kupfergehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Extinktionen (Mittelwerte)*	Plazenta-Stammlösungen (ppm Cu)	Trocken-material (ppm Cu)	Frisch-material (ppm Cu)
F	0,332	0,208	10,42	1,79
G	0,340	0,213	10,67	1,82
H	0,254	0,159	7,97	1,37
I	0,206	0,129	6,46	1,11
J	0,227	0,142	7,12	1,22
K	0,160	0,100	5,02	0,86
L	0,202	0,127	6,34	1,09
M	0,174	0,109	5,46	0,94
N	0,199	0,125	6,24	1,07
O	0,238	0,149	7,47	1,28
P	0,203	0,127	6,37	1,09
Q	0,226	0,142	7,09	1,22
R	0,235	0,147	7,37	1,26
S	0,223	0,140	7,00	1,20
T	0,208	0,130	6,52	1,12
U	0,213	0,134	6,68	1,14
V	0,224	0,141	7,03	1,20
X	0,182	0,114	5,71	0,98
Y	0,211	0,132	6,62	1,14
Z	0,245	0,154	7,69	1,32

* Mittelwerte von je drei Bestimmungen

Tabelle 7 Kupfergehalt der normalen reifen bluthaltigen menschlichen Plazenta

Statistische Auswertung	Trockenmaterial (ppm Cu)		Frischmaterial (ppm Cu)	
n = 20	MG	KB	MG	KB
$S = \sqrt{\frac{\sum_1^n \delta_i^2}{n-1}}$	7,06 ± 1,04	5,02 bis 10,67	1,21 ± 0,18	0,86 bis 1,28
$E = \bar{x} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$				

* MG = mittlerer Gehalt KB = Konzentrationsbereich

Tabelle 8 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Plazentalösung E 50% (ml)	Zusatz (µg Cu)	Gesamter Cu-Gehalt (µg Cu/25 ml)	Wiederfindungsrate (%)
25	-	1,82	100,0
20	-	1,46	101,4
20	2,5	3,96	101,5
20	5,0	6,46	99,0

4.2. Anwendung einer kombinierten extraktiv-spektralphotometrischen Methode zur Bestimmung des Zinkgehaltes in Humanplazenten

Einleitung

Seitdem Zusammenhänge mit verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Störungen diskutiert werden, ist die Bedeutung des Zinks gestiegen. Zink, Bestandteil einer Reihe von etwa 59 Enzymen, wirkt als Stabilisator biologischer Membranen und ist auf noch unbekannte Weise an der RNA- und DNA-Biosynthese beteiligt (69, 70). Experimenteller Zinkmangel soll beim Tier Wachstumsstörungen, Haarausfall, Sterilität und Störung der Wundheilung verursachen. Die günstige Wirkung mancher Plazenta-Extrakte mit hohem Phosphat-Gehalt bei Wundheilung hängt möglicherweise mit dem Zinkgehalt der alkalischen Phosphatase zusammen, da Vitamin A, das ein wesentlicher Faktor der Gewebeheilung ist, nur in Gegenwart ausreichender Mengen von Zink verwertet werden kann (71).

Ob der im Haar von Studenten mit hohem Intelligenzquotienten festgestellte sehr hohe Zink- und Kupfergehalt darauf hindeutet, daß möglicherweise der Intelligenzgrad mit der Zinkaufnahme zusammenhängt, ist wissenschaftlich noch nicht bewiesen worden. Möglich wäre es, zumal in Tierexperimenten an Ratten dieser Zusammenhang schon bestätigt wurde.

Zink ist auch Bestandteil des Insulins und des Enzyms Carboanhydrase. Es soll beim Dämmerungssehen und bei photochemischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Ferner hat Zink bei der Insulinspeicherung in der Bauchspeicheldrüse eine nicht unwesentliche Bedeutung.

In letzter Zeit mehren sich nun die Stimmen, die darauf hinweisen, daß die isolierte Betrachtung eines einzelnen Elementes u.U. zu Fehlschlüssen führen kann. Da die Spurenelemente sich gegenseitig beeinflussen können, ist es zur Klärung physiologischer Fragen erforderlich, daß man alle in Betracht kommenden Mikroelemente bestimmt. Deshalb wird heutzutage die

Wechselwirkung zwischen Zink und verschiedenen Metallspuren intensiv untersucht.

Es ist allgemein bekannt, daß die Industrialisierung u.a. eine Erhöhung des Schwermetallgehaltes in der Umwelt mit sich bringt. Durch die Umweltverschmutzung gerät das Kadmium und andere Schwermetalle letztlich in den menschlichen Organismus. Gewisse synthetische Produkte, die in Haushalten verwendet werden, verändern die Verteidigungsgrenze der Gebärmutter und ermöglichen dadurch die toxische Wirkung des Kadmiums auf die Embryonen (72, 73). Das Studium der biologischen Bedeutung des Kadmiums und der Verhinderung seiner toxischen Wirkung durch das Zink sollte noch mehr vertieft werden.

Bei der Laktation und Gravidität scheint das Zink eine große Rolle zu spielen (4). Neben Kupfer übt Zink eine sehr wichtige Funktion in der Plazenta aus, insbesondere für die Entwicklung und intrauterines Wachstum des Fetus. Zusammenhänge zwischen mütterlichem Zinkmangel und Fehlbildung bleiben aber noch unbewiesen (74). Trotz all dieser Tatsachen ist über die Zink-Untersuchung in menschlichen Plazenten eine sehr mangelhafte Literatur zu finden; bisher gibt es nur eine Veröffentlichung über ihre Bestimmung in normalen, bluthaltigen Humanplazenten (75).

Infolge des zunehmenden Interesses an der Rolle der Spurenelemente in der Physiologie und Pathologie werden neue zuverlässige analytische Techniken weiterhin benötigt. Spektralphotometrische Methoden sind immer von großer Wichtigkeit, vor allem wegen ihrer Zugänglichkeit, hohen Genauigkeit und ihres geringen Aufwandes. Die Anwendung einer extraktiv-spektralphotometrischen, kombinierten Dithizon-Zincon-Methode zur Zinkbestimmung in der Humanplazenta ist deshalb nach unserer Ansicht angebracht und vorteilhaft.

Methodik

Mikromengen an Zink bestimmt man meistens spektralphotometrisch mit Dithizon (76 - 86) und Zincon (54, 87 - 92), aber

auch mit PAN (93), TAR (94) und 5-Cl-ß-PAN (95). Alle diese Reagenzien sind wenig selektiv und erfordern nicht selten eine Vortrennung des Zinks. Hieraus ergibt sich die Forderung nach besseren spektralphotometrischen Methoden zur einwandfreien Bestimmung von Zinkspuren.

Bei der Analyse von Zinkspuren in biologischem und organischem Material werden häufig extraktiv-spektralphotometrische Methoden verwendet. Die klassische Dithizonmethode (96) und ihre verschiedenen Varianten besitzen bei großem Zeitaufwand schlechte Selektivität. Entsprechendes gilt auch für das zweite meist angewendete Zink-Reagenz Zincon. Dennoch kann ein kombiniertes Verfahren beider zu einer besseren Methode führen: Gallo u. Soares (54) sowie Mizuno u. Mitarb. (88) haben über zwei verschiedene Verfahren einer kombinierten Dithizon-Zincon-Methode zur Mikrobestimmung des Zinks in pflanzlichem Material berichtet, die jedoch noch relativ umständlich sind. Die von Passos (89) beschriebene spektralphotometrische Dithizon-Zincon-Zinkanalyse von Bodenproben ist dagegen einfacher und erschien uns geeignet, um auf ihrer Grundlage zu einem modifizierten verbesserten Verfahren der Bestimmung von Zinkspuren zu gelangen.

Dithizon-Zincon-Methode: Zincon gibt mit Zink bei pH 8,5 bis 9,5 einen wasserlöslichen blauen Komplex, der eine empfindliche, aber wenig selektive Bestimmung ermöglicht, so daß es notwendig ist, Zink vor der Analyse abzutrennen.

Zink bildet in annähernd neutraler bis schwach alkalischer Lösung mit Dithizon ein primäres Dithizonat, das mit CCl_4 (oder $CHCl_3$) mit purpurroter Farbe extrahierbar ist. Führt man die Extraktion des Zinks mit in CCl_4 gelöstem Dithizon (pH 6,5 - 7,5) durch, sind die Störungen durch andere Elemente geringer (97). Man kann auf diese Weise die Spezifität der Extraktion erhöhen, da bei diesen pH-Werten nur noch Zn, Pb, Cd, Co und Ni reagieren. Mit verd. HCl (1 : 500) kann das Zink aus der CCl_4-Phase reextrahiert werden, wobei säurestabiles Dithizonat (wie von Co und Cu) zurückbleiben. Da die Zinkkonzentra-

tion im biologischen Material sehr viel höher als die aller übrigen Störelemente (Ni, Cd) liegt, wird die Extraktion praktisch spezifisch. Anschließend führt man die Zinkbestimmung in den sauren Extrakten mit der Zinconmethode bei pH 9,0 durch, wobei ein Absorptionsmaximum zu erhalten ist.

Arbeitsvorschrift:

Reagenz: 2-Carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzol (Zincon) - $C_{20}H_{15}N_4NaO_6S \cdot H_2O$ (Abb. 5)

Empfindlichkeit: $\epsilon_{625\ nm} = 2,4 \cdot 10^4\ l.mol^{-1}.cm^{-1}$

Relative Standardardabweichung: $V_{5\mu g\ Zn} = \pm 3,0\%$

Messungen: In 1 cm-Küvetten gegen Blindproben

Lösungen:
1. Reagenzlösung: 0,130 g Zincon werden in 2 ml N NaOH gelöst und auf 100 ml aufgefüllt
2. 0,01%ige Dithizonlösung in CCl_4
3. Pufferlösungen: pH 9,0 (Puffer-Titrisol) und pH 6,0 (40,4% 0,1 N NaOH / 0,1 M Zitronensäure)
4. Zinkstammlösung: 1g Zn . l^{-1} Titrisol)
5. NaOH: 40%ig und 1 Molar
6. HCl (Suprapur 1:500)

Herstellung der Eichkurve:

a) Extraktion des Zinkdithizonats: Es wurden Zinklösungen im Bereich von 0,5 - 3,0 μg Zn.ml^{-1} durch angemessene Verdünnung der Zinkstammlösung und nach Zugaben von Trinatriumzitrat-2-hydrat (wie für die Plazenta-Stammlösungen) hergestellt. Von diesen Lösungen wurden dann je 20 ml (neutral oder schwach sauer) in einen 100 ml-Scheidetrichter einpipettiert, danach 5ml Pufferlösung pH 6,0 und 5 ml 0,01%ige Dithizonlösung zugegeben und dann 2 Min. lang geschüttelt. Die organische Phase wurde in einen zweiten 100ml-Scheidetrichter überführt und der Extraktionsprozeß wiederholt, bis die charakteristische grüne Farbe der Dithizonlösung unverändert blieb.

b) Zerstörung des Zinkdithizonats: In den zweiten Scheidetrichter, in welchen alle organischen Extrakte gesammelt worden sind, wurden 10 ml der Salzsäurelösung einpipettiert und die

Mischung 1 Min. lang geschüttelt. Dann wurde die organische Phase in einen dritten Scheidetrichter überführt und wiederum mit 10 ml Salzsäurelösung 1 Min. lang geschüttelt. Nach der Trennung der organischen Phase wurden die beiden sauren Extrakte im zweiten Scheidetrichter gesammelt und mit 1 ml CCl_4 gewaschen.

c) Bildung des Zinkzinconats: Nach der Entfernung der CCl_4-Phase wurde der saure Extrakt zu einem neutralen oder schwach alkalischen pH adjustiert. Dann wurde 10 ml Pufferlösung vom pH 9,0 und 3 ml Reagenzlösung einpipettiert und das Ganze quantitativ in einen 50 ml-Meßkolben gebracht. Nach Auffüllung zur Marke mit demineralisiertem, destilliertem Wasser wurde die Extinktion bei 625 nm gegen die Blindprobe gemessen. Die Ergebnisse einer Reihe von drei doppelten Bestimmungen jeder Standardlösung zur Aufstellung der Eichkurve sind in Tabelle 5 angegeben. Das Lambert-Beersche Gesetz wird im gesamten angeführten Konzentrationsbereich erfüllt und somit eine gradlinige Eichkurve erreicht (Abb. 7).

Untersuchung der Plazenta-Stammlösungen: Es wurden genau 75 ml der Plazenta-Stammlösung in 100 ml-Meßkolben eingefüllt und mit Hilfe der Natriumhydroxidlösungen zu einem neutralen oder schwach sauren pH adjustiert. Nach Auffüllung zur Marke mit demineralisiertem, destilliertem Wasser wurden je 20 ml (wie vorher für die Zinklösungen) extrahiert, reextrahiert und nach der Zinkzinconatbildung gegen die Blindprobe gemessen.

Zinkgehalt der Plazenta: Die 20 Plazenta-Stammlösungen wurden einzeln in einer Reihe mit je drei doppelten Bestimmungen untersucht (Tabelle 6). Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- bzw. Frischmaterial sind in Tabelle 7 angegeben. Zur Prüfung der analytischen Eigenschaften der Methode wurde eine 75%ige Lösung der Plazenta-Stammlösung E, deren Zinkgehalt bekannt war, benutzt. Aliquote Mengen der Zinklösungen wurden hinzugefügt und die Wiederfindungsrate getestet. Die Ergebnisse gibt Tabelle 8 wieder.

Blindprobe: 10 ml Pufferlösung vom pH 9,0 und 3,0 ml Reagenzlösung wurden mit demineralisiertem, destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Resultate und Diskussion

Der Konzentrationsbereich des Zinks in Humanplazenten erlaubt eine einfache spezifische Bestimmung mit der verbesserten extraktiv-spektralphotometrischen Dithizon-Zincon-Methode. Die Überprüfung der Bestimmungsmethode zeigte gute analytische Eigenschaften. Die beiden möglichen Interferenten (Cd, Ni) sind im extremen Spurenbereich anwesend, so daß die Analyse störungsfrei verläuft.

Wir haben durch die Anwendung der spezifischen Dithizon-Zincon-Methode einen Zinkgehalt von 11,13 $\pm$ 0,62 ppm im Frisch- und 64,98 $\pm$ 3,34 ppm im Trockenmaterial gefunden. In der einzigen bisher bekannten Arbeit (71) über den Zinkgehalt der normalen, bluthaltigen Humanplazenten sind sechsmal so hohe Werte angegeben worden: 61,0 bzw. 361,0 ppm. Die Diskrepanz ist nach unserer Ansicht auf die weniger spezifische Methodik zurückzuführen, da hier eine ältere titrimetrische Methode benutzt worden war.

Aus der Differenz zwischen Gesamtgehalt und Blutzinkgehalt läßt sich auch der Gewebegehalt errechnen, da der Blutgehalt der normalen, reifen Humanplazenta im Durchschnitt 12,0% beträgt (59).

Ein gesunder Erwachsener enthält etwa 1,4 bis 2,3 g Zink (66), und der Gesamtgehalt einer normalen menschlichen Plazenta beträgt ca. 1 - 2% des Gesamtzinkvorkommens des Erwachsenenkörpers. Damit gehört die normale reife Plazenta zu den zinkreichen Organen des Körpers.

Anmerkungen

Da Kupfer und insbesondere Zink sehr häufig vorkommende Metalle sind, ist extrem sorgsames Arbeiten notwendig, um niedrige und konstante Blindwerte zu erhalten. Hochreinheitsgradige Reagenzien wurden verwendet (Suprapur, zur Analyse und Titrisole Merck). Alle für die Versuche verwendeten Glasapparaturen wurden vor den Versuchen mit einer 0,01%igen Dithizonlösung in CCl_4 und anschließend mit Chloroform z.A. sorgfältig gewaschen.

Die verwendeten Apparate:

- Beckmann DB-GT Spektralphotometer
- Schüttelmaschine W-3 Hormuth Vetter
- Theodor Karow Präzisions-pH-Meter

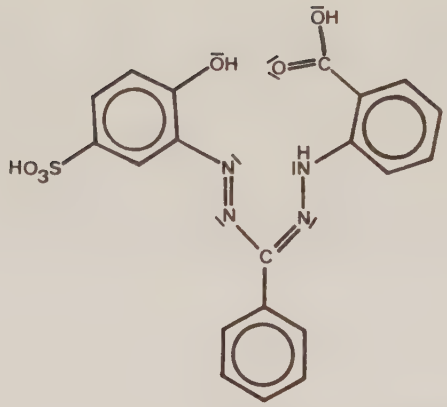

Abb. 9

2-Carboxy-2'-hydroxy-5'-sulfoformazylbenzol
(Zincon)

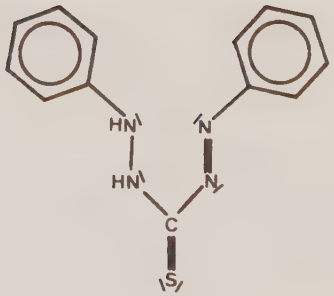

Abb. 10

Diphenylthiocarbazon
(Dithizon)

Tabelle 9 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der Dithizon-Zincon-Methode

Zn-Standard -Lösungen (µg Zn/ml)	Gesamte Menge (µg Zn/50 ml)	Extinktionen						Mittelwerte
0,2	10	0,140	0,138	0,125	0,124	0,135	0,135	0,133
0,4	20	0,262	0,262	0,266	0,265	0,268	0,268	0,265
0,6	30	0,415	0,415	0,415	0,415	0,422*	0,422*	0,415
0,8	40	0,562	0,562	0,558	0,558	0,560	0,558	0,560
1,0	50	0,690	0,690	0,705	0,705	0,675	0,675	0,690
1,2	60	0,822	0,825	0,770	0,770	0,865	0,865	0,820

* Ausgeschlossen nach dem Q-Test von Dean und Dixon (68)

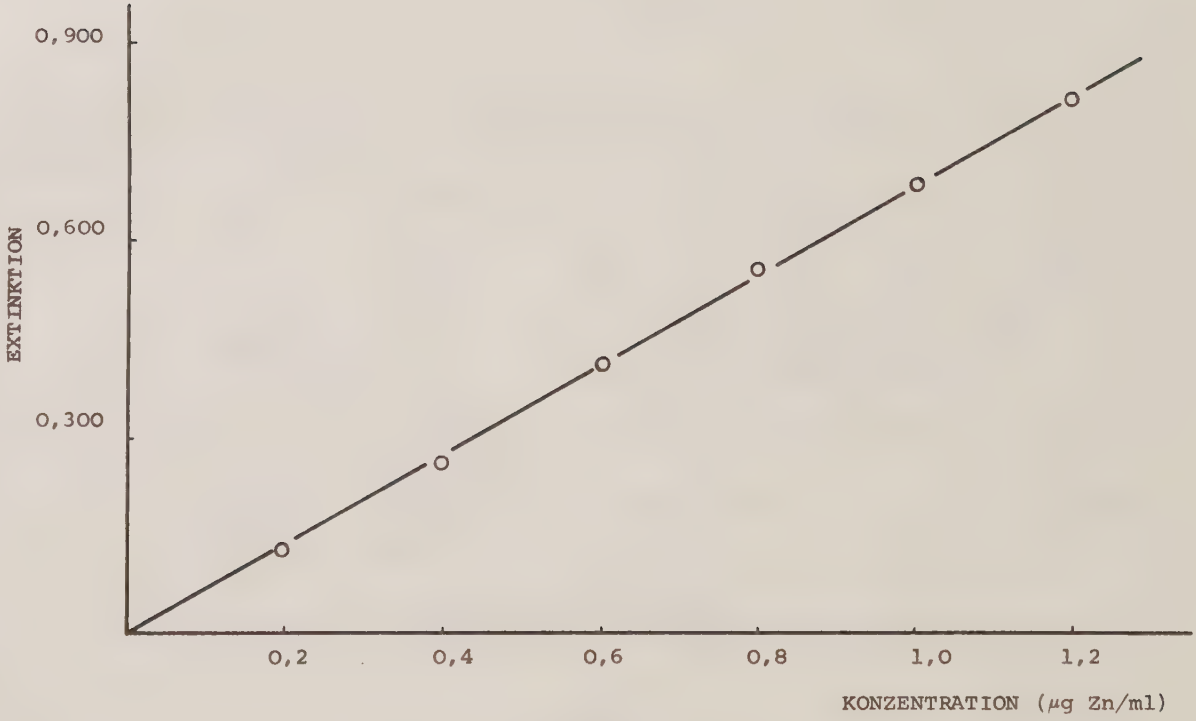

Abb. 11

Eichkurve der Dithizon-Zincon-Methode im Bereich von 0,2 bis 1,2 µg $Zn.ml^{-1}$ bei 625 nm in 1 cm-Küvette

Tabelle 10 Zinkgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Extinktion * (Mittelwerte)	Plazenta-Stammlösungen (ppm Zn)	Trocken-material (ppm Zn)	Frisch-material (ppm Zn)
F	0,286	1,39	69,58	11,92
G	0,258	1,24	62,08	10,63
H	0,310	1,50	75,00	12,84
I	0,272	1,32	66,25	11,34
J	0,252	1,22	60,83	10,42
K	0,244	1,18	59,17	10,13
L	0,276	1,28	64,17	10,99
M	0,258	1,24	62,08	10,63
N	0,270	1,31	65,42	11,20
O	0,236	1,14	57,08	9,78
P	0,262	1,27	63,33	10,84
Q	0,272	1,32	66,25	11,34
R	0,280	1,35	67,50	11,56
S	0,272	1,32	66,25	11,34
T	0,254	1,22	61,25	10,49
U	0,236	1,14	57,08	9,78
V	0,282	1,37	68,33	11,70
X	0,268	1,30	65,00	11,13
Y	0,290	1,40	70,00	11,99
Z	0,300	1,46	72,92	12,49

* Mittelwerte von je drei doppelten Bestimmungen.

Tabelle 11 Zinkgehalt der normalen reifen bluthaltigen menschlichen Plazenta

Statistische Auswertung	Trockenmaterial (ppm Zn)		Frischmaterial (ppm Zn)	
n = 20	MG	KB	MG	KB
$S = \sqrt{\frac{\sum_1^n \delta_i^2}{n-1}}$	64,98 ± 3,34	57,08 bis 75,00	11,13 ± 0,62	9,78 bis 12,84
$E = \bar{x} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$				

MG = mittlerer Gehalt KB = Konzentrationsbereich

Tabelle 12 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Plazentalösung E 50% (ml)	Zusatz (µg Zn)	Gesamter Zn-Gehalt (µg Zn/50 ml)	Wiederfindungsrate (%)
25	-	22,00	-
20	-	17,62	100,0
20	10	27,88	100,9
20	25	43,38	101,7

5. Atomabsorptionsspektralphotometrische Bestimmung von Spurenelementen der menschlichen Plazenta

Die Atomabsorptionsanalyse zur quantitativen Bestimmung von Spuren metallischer Elemente in vielfältiger, chemischer Matrix ist eine sehr wichtige Untersuchungsmethode der modernen Laboranalytik geworden (98). Die hohen Nachweisgrenzen, die mit neuesten Geräten erzielt werden, lassen diese Methode für den Einsatz im Rahmen klinisch-chemischer Bestimmungen essentieller wie auch toxischer Elemente für eine Vielzahl von Anwendungsgebieten geeignet erscheinen. Die Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) zeichnet sich heute neben der bekannten Spezifität, Selektivität und Störfreiheit besonders durch eine hohe Flexibilität und Einsatzbreite aus, die in der Vielfalt der zur Verfügung stehenden Atomisierungsmöglichkeiten begründet liegt (99). Während die Flamme sich seit Jahren für den routinemäßigen Einsatz zur Bestimmung von Haupt- und Nebenbestandteilen verschiedener Materialien mit hoher Präzision bewährt hat und sich zu Metallspurenanalysen auf allen Gebieten der Analytik eignet, erweitert die flammenlose Atomabsorptionsspektralphotometrie (FAAS) diesen Einsatzbereich erheblich nach unten. Mit ihren Nachweisgrenzen im Picogrammbereich tritt sie dabei in Konkurrenz mit den aufwendigsten Analysenverfahren, denen sie nicht nur wegen ihres erheblich niedrigeren Preises, sondern auch wegen der geringeren Anforderungen deutlich überlegen ist.

Durch die laufenden Verbesserungen der Brenner und der Nachfolgeelektronik bei der AAS mit der Flammenatomisierung und vor allem durch die Entwicklung der flammenlosen Atomisierungsmethoden ist die AAS neben der Neutronen-Aktivierungs-Analyse (NAA) zu einem der selektivsten und empfindlichsten Spurenanalysenverfahren geworden, das für die quantitative Bestimmung sehr vieler Elemente eingesetzt werden kann, und in seiner Nachweisgrenze teilweise sogar die NAA mit thermischen Neutronen übertrifft. Mit den flammenlosen Anordnungen

werden höchste Nachweisempfindlichkeiten bei gleichzeitigem minimalem Probenverbrauch erreicht, die mit den Empfindlichkeiten der NAA und der inversen Voltametrie (IV) gleichziehen oder diese sogar übertreffen (15).

Verschiedene Atomisierungsverfahren sind für die AA-Methode entwickelt worden: Flammenverfahren, Kohlefadentechnik, Delves-System, Tantalschiffchenverfahren, Graphitofentechnik, Kalt-Dampfverfahren, usw... Nach dem heutigen Stand der Technik wird die Probenatomisierung meistens in Laminarbrennern für Luft/Azetylen bzw. Lachgas/Azetylen oder in flammenlosen Anordnungen wie geheizte Graphitöfen und Kalt-Dampfverfahren durchgeführt.

Durch die flammenlose Atomisierung im Graphitrohrofen hat die AAS in den letzten Jahren eine Fülle neuer Impulse erhalten. An erster Stelle sei dabei die um zwei bis drei Größenordnungen gesteigerte Empfindlichkeit genannt; dadurch wurde es möglich, den stetig steigenden Anforderungen auf den verschiedensten Gebieten der Analytik gerecht zu werden, ohne auf zeitraubende Anreicherungsschritte ausweichen zu müssen. Darüber hinaus wurden der AAS neue Gebiete erschlossen, die bisher nur von wesentlich aufwendigeren Analysenverfahren bedient werden konnten (100).

Auf Grund der Verwendung element-spezifischer Linien glaubte man am Anfang, in der AAS ein relativ störungsfreies Analysenverfahren zu haben. Später zeigte sich, daß doch in einem stärkeren Maße mit Störungen zu rechnen ist. Besonders bei der AAS mit flammenloser Anregung gelangt man allmählich zu der Einsicht, daß sie für die meisten Elemente weitaus störungsanfälliger ist, als vielfach angenommen wird (101). Eine große Anzahl von Matrixeffekten bei der Bestimmung verschiedener Elemente sind bereits aufgefunden worden. Hohe Fremdsalzkonzentrationen führen zu mehr oder weniger starken Depressionen, wobei die auftretende Signalunterdrückung anscheinend durch Wechselwirkungen in der Gasphase zwischen den zu bestimmenden Elementen und den ebenfalls verdampfenden und schnell wieder kondensierenden Begleitelementen hervorgerufen werden.

Auch ist eine Wechselwirkung mit dem Ofenmaterial bei den hohen Atomisierungstemperaturen ebensowenig auszuschließen wie Reaktionen mit nicht flüchtigen Probenkomponenten. Der Einfluß von Säuren bzw. Anionen auf die Analysensignale wurde schon frühzeitig beobachtet. Selbst einfache organische Lösungsmittel können die Signalhöhe in beide Richtungen beeinflussen, ebenso wie die Gegenwart organischer Komplexbildner.

Die Anwendung der Untergrund-Kompensations-Technik in der AAS erlaubte andererseits die Analyse von Proben mit relativ komplexen Matrices. Diese instrumentelle Technik ist entwickelt worden, um die aus Lichtzerstreuung und unspezifischer Absorption entstandenen Interferenzen zu kompensieren. In Verbindung mit hochleistungsfähigen Graphitrohröfen und der Additionsmethode können sehr niedrige Elementgehalte in komplexen Proben mit einem Minimum an Probenvorbereitungen bei gleichzeitiger hoher Genauigkeit bestimmt werden (102). Das Verfahren der Untergrundkorrektur mit Hilfe des breiten Dissoziationskontinuums des Deuteriums ist aber nicht nur bei der Verwendung der FAAS einsetzbar, sondern ebensogut bei Arbeiten mit der Flamme, womit auch bei der im Augenblick noch gebräuchlichsten Atomisierungsmethode die zwar verminderten aber auch hier zu Fehlern führenden unspezifischen Absorptionen korrigiert werden können.

Besonders für die extreme Spurenanalyse läßt sich daraus folgern, daß die FAAS nur dann optimal als nachweisstarkes Verfahren eingesetzt werden kann, wenn das zu bestimmende Element in isolierter Form in schwach saurer Lösung vorliegt. Bei allen anderen Analysenvorschriften ist eine umfangreiche kritische Überprüfung des Verfahrens unerläßlich. Ein weiteres Problem ist die unkritische Anwendung des Deuterium-Untergrund-Kompensators (DUK), welcher nur teilweise die unspezifische Absorption kompensieren kann. Selbst die Anwendung der Additionsmethode ist ernsten Begrenzungen unterworfen.

Sehr kritische Optimierungsarbeiten müssen von Fall zu Fall der Ausarbeitung einer zuverlässigen Analysenvorschrift vorausgehen, wenn das Analysenergebnis nicht durch systemati-

sche Fehler um sogar mehrere Größenordnungen verfälscht werden soll (101).

Aus bisherigen Erfahrungen in der FAAS kann man folgende praktische Regeln zusammenfassen (103):

a) Bei der direkten Untersuchung biologischen Materials ohne Abtrennung oder Anreicherung muß mit Störungen durch Rauch gerechnet werden; sie lassen sich nur teilweise durch Verwendung eines DUKs ausschalten;
b) wenn es möglich ist, die biologische Probe stark zu verdünnen, können Einflüsse dritter Partner vernachlässigt werden;
c) bei der Untersuchung wenig verdünnter oder unverdünnter Proben muß mit einem erheblichen Einfluß dritter Partner gerechnet werden;
d) der Einfluß dritter Partner kann durch Zusatz von bestimmten Reagenzien (z.B. Säure) vermindert werden;
e) der Einfluß dritter Partner ist auch bei gleichartigen Materialien von Probe zu Probe verschieden; es werden Signalerniedrigung sowohl wie Signalerhöhung gefunden;
f) bei der Untersuchung wenig verdünnter oder unverdünnter Proben muß die quantitative Bestimmung für jede einzelne Probe nach der Additionsmethode durchgeführt werden.

Insgesamt gesehen stellt aber die flammenlose AAS in der Graphitrohrküvette eine ideale Ergänzung und Erweiterung der konventionellen Flammen-AAS dar und läßt sich praktisch überall dort vorteilhaft einsetzen, wo die Empfindlichkeit der klassischen AAS nicht mehr ausreicht. Als besonders interessanter Anwendungsbereich der FAAS hat sich inzwischen die biochemische Forschung mit ihren oft extrem kleinen Probenmengen erwiesen.

Zuletzt sei hier auf physikalische Grundlagen der AAS nicht im einzelnen eingegangen, zumal darüber ganze Kapitel in Spezialbüchern geschrieben worden sind (100, 104-107).

51. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Zinkgehaltes in Humanplazenten

Über die Anwendung einer spezifischen extraktiv-spektralphotometrischen Dithizon-Zincon-Methode wurde im Abschnitt 4.2. berichtet. Nun wird erneut der Zinkgehalt menschlicher Plazenten mittels der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie (FAAS) in der Graphitrohrküvette bestimmt.

Zink gehört zu den am häufigsten mittels AAS bestimmten Elementen. Die Anwendung der AAS als analytisches Werkzeug in der klinisch-chemischen Diagnostik, Prognostik und Therapie brachte Präzision und Zuverlässigkeit für die Zinkanalyse in Körperflüssigkeiten und Geweben (108-122).

Ein wesentlich spezifischeres Verfahren ist aber die Zinkbestimmung mittels der flammenlosen Anregung. In der Graphitrohrküvette lassen sich im Prinzip noch weniger als 10^{-13}g Zn nachweisen, womit dieses Element die größte Empfindlichkeit zeigt. Wegen der enorm großen Kontaminationsgefahr und der Allgegenwärtigkeit von Zn selbst in reinen Wassern, ist es bisher nicht gelungen, diese Nachweisgrenze echt zu erreichen (100).

Obwohl Zink eines von den meist untersuchten Spurenelementen ist, bleiben verschiedene Lücken in den Kenntnissen seines Metabolismus und seiner Funktionen (70, 74, 123-129).

Methodik

Die angewendeten Arbeitstechniken sind natürlich nicht bezüglich aller Parameter optimiert, haben aber verschiedene Vorteile für die FAAS-Bestimmung der zu untersuchenden Spurenelemente in dem gegenwärtigen Aufschlußmaterial. Die manuelle Pipettierung von 20 - 50 µl Probenflüssigkeit in die relativ kleine Probenöffnung der Graphitrohrküvette ist sicherlich kritisch; trotzdem war der Variationskoeffizient des Einzelwertes unter 6% geblieben. Der Lampenstrom wurde nach der entsprechenden Bedienungsanleitung eingestellt. Die Untersu-

chungen sind durch Mehrfachbestimmungen gesichert. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die flammenlosen AAS-Bestimmungen sind in Tabelle 13 bzw. 14 zusammengefaßt.

Analysengerät: Die Durchführung der Bestimmungen erfolgte mit Hilfe eines Perkin-Elmer AAS 300-Gerätes, das mit einem Deuterium-Untergrund-Kompensator, einem Servogor S Schreiber und mit eingebauter Graphitrohrküvette HGA-70 ausgerüstet ist.

Materialien: Die Durchführung von Analysen mit der Graphitrohrtechnik erfordert infolge ihrer hohen Empfindlichkeit höchste Ansprüche an sauberes und exaktes Arbeiten (130). Meßkolben und Probenflaschen aus Poliäthylen wurden vor ihrer Benutzung gründlich mit verd. HNO_3 gereinigt, um Metallspuren zu beseitigen. Zum Nachwaschen wurde demineralisiertes, destilliertes Wasser verwendet. Die ebenso behandelten Pipettenspitzen wurden vor dem Einspritzen dreimal mit der zu dosierenden Lösung ausgespült.

Arbeitsvorschrift

Die Zinkbestimmung wurde im Routineverfahren durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der spektralphotometrischen Dithizon-Zincon-Methode (Referenzmethode) verglichen.

Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen wurden 1 : 100 mit 0,01 N HCl verdünnt. Diese Verdünnung erlaubte eine störungsfreie Analyse mit der Graphitrohrtechnik bei maximal anwendbarer thermischer Zersetzungsstufe (490°C) für Zink in solcher Matrix. Da die eingespritzte Probelösung weitgehend von störenden Matrix-Effekten befreit ist, war die Verwendung des Untergrund-Kompensators nicht erforderlich.

Reagenzien: Zn-Stammlösung = Titrisol (1g $Zn.l^{-1}$)

Zinklösungen = 5 bis 30 ppb Zn in Blindlösung

Blindlösung = 0,2% Trinatriumzitrat-2-hydrat in 3%igen H_2SO_4 wurde 1:100 mit 0,01 N HCl verdünnt

Blindwert: 3,12 ppb Zn; aus der Eichkurve = 4,25 ppb Zn

Referenzmethode: extraktiv-spektralphotometrische Dithizon-Zincon-Methode
Optimaler Arbeitsbereich: 5,0 - 25,0 ppb Zn (Standardkurve Abb. 12)

Der Zinkgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 16 wieder. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und Frischmaterial sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Resultate und Diskussion

Die Ergebnisse der FAAS-Bestimmung des Zinkgehaltes der normalen bluthaltigen Humanplazenten sind 6,4% höher als die von uns mit der spektralphotometrischen Referenzmethode erzielten Mittelwerte: 69,02 $\pm$ 4,23 ppm Zn im Trocken- bzw. 11,83 $\pm$ 0,72 ppm Zn im Frischmaterial.

Hiermit erweist sich die flammenlose Atomabsorptionsspektralphotometrie mit der Graphitrohrküvette noch einmal als eine genaue, zuverlässige Methode zur Bestimmung von Zinkspuren in biologischem Material.

Tabelle 13 FAAS-Technik: Geräteeinstellung

Parameter	Zn	Cu	Mn	Fe	Cd
Wellenlänge (nm)	213,9	324,7	279,5	248,3	228,8
Spalt (nm)	0,7	0,7	0,2	0,2	0,7
Schreiber (mV)	10	10	10	10	10
Lampe*	M.E.L.	M.E.L.	M.E.L.	M.E.L.	HKL
Meßart	Ext/Just	Ext/Just	Ext/Just	Ext/Just	Ext/Just
DUK	Aus	Aus	An	Aus	An
Gasstop	Aus	Aus	Aus	Aus	Aus

* M.E.L. = Cu/Fe/Mn/Zn Multi-Element-Lampe
HKL = Hohlkathodenlampe

Tabelle 14 FAAS-Technik: HGA-Programmierung

Programmierung	Zn	Cu	Mn	Fe	Cd
Trocknung (s)	20	30	60	20	30
Therm. Zersetzung (s)	20	30	60	30	45
Atomisierung (s)	10	20	20	10	20
Programm	5	7	7	7	5
Spannung (V)	5	9,5	10	9,5	5,5
Einspritzmenge (μl)	20	20	50	20	20
Spülgas*	N_2	N_2	N_2	N_2	N_2
GR-Typ	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Ausheizen (s)	10	10	10	10	10

* Nachgereinigter Stickstoff, Vordruck 2 atü

Tabelle 15 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der FAAS-Bestimmung von Zink in Humanplazenten

Konzentration (ppb Zn)	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwert (%)
5,0	9,60	11,00	10,30
10,0	16,13	16,13	16,13
15,0	20,47	20,98	20,72
20,0	25,60	26,97	26,28
25,0	30,10	32,40	31,25
30,0	33,50	35,30	34,40

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

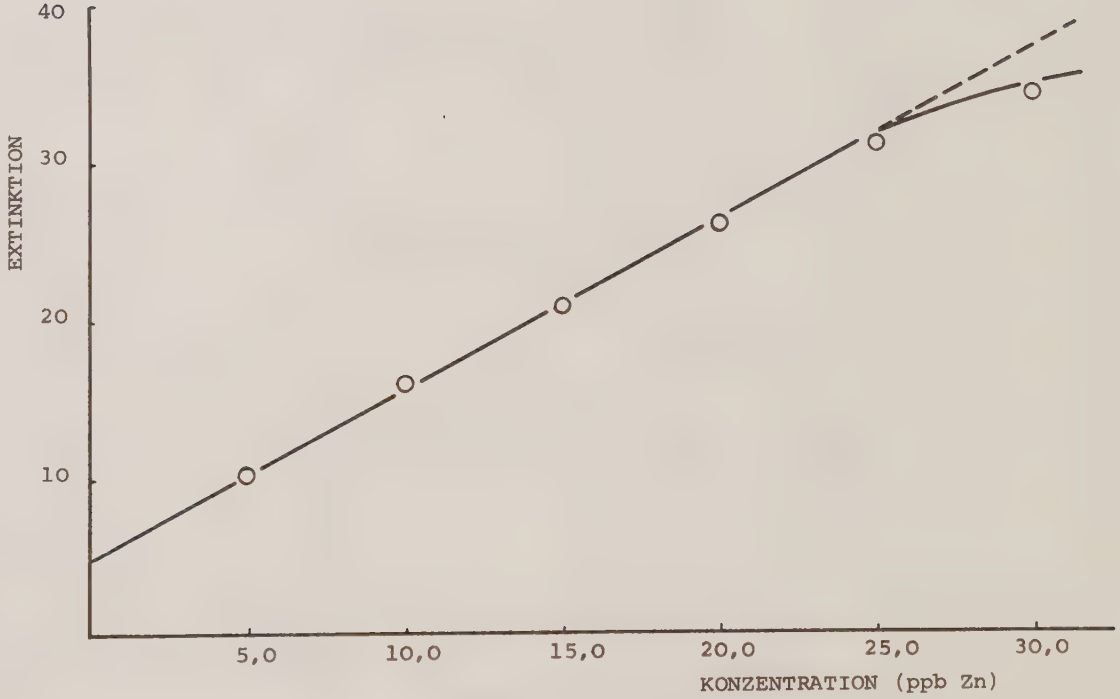

Abb. 12

Standardkurve zur FAAS-Bestimmung des Zinkgehaltes
nach dem Routineverfahren

Tabelle 16 Zinkgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Extinktionen (Mittelwerte)* (%)	Plazenta-Stamm-Lösungen (ppm Zn)		Trockenmaterial (ppm Zn)		Frischmaterial (ppm Zn)	
		Spekt.	FAAS	Spekt.	FAAS	Spekt.	FAAS
F	20,7	1,39	1,47	69,58	73,30	11,92	12,56
G	20,3	1,24	1,43	62,08	71,45	10,63	12,25
H	23,0	1,50	1,68	75,00	83,80	12,84	14,36
I	20,6	1,32	1,46	66,25	72,85	11,34	12,49
J	18,8	1,22	1,29	60,83	64,60	10,42	11,07
K	18,3	1,18	1,25	59,17	62,35	10,13	10,69
L	19,6	1,28	1,36	64,17	68,25	10,99	11,70
M	18,8	1,24	1,29	62,08	64,60	10,63	11,07
N	20,8	1,31	1,48	65,42	73,75	11,20	12,64
O	17,4	1,14	1,16	57,08	58,22	9,78	9,98
P	18,5	1,27	1,26	63,33	63,25	10,84	10,84
Q	19,2	1,32	1,33	66,25	66,45	11,34	11,39
R	19,7	1,35	1,38	67,50	68,75	11,56	11,78
S	19,2	1,32	1.32	66,25	66,22	11,34	11,35
T	20,3	1,22	1,43	61,25	71,45	10,49	12,25
U	19,2	1,14	1,33	57,08	66,45	9,78	11,39
V	20,8	1,37	1,48	68,33	73,75	11,70	12,64
X	19,1	1,30	1,32	65,00	65,99	11,13	11,31
Y	20,0	1,40	1,40	70,00	70,10	11,99	12,02
Z	21,0	1,46	1,50	72,92	74,90	12,49	12,84

* Mittelwerte von je drei doppelten Messungen
Spekt. = Spektralphotometrie

Tabelle 17 Spurenelementgehalt der normalen reifen bluthaltigen menschlichen Plazenta

Statistische Auswertung	Spuren-elemente	Trockenmaterial (ppm)		Frischmaterial (ppm)	
		MG	KB	MG	KB
$n = 20$	Zn	69,02 ± 4,23	58,22 - 83,80	11,83 ± 0,72	9,98 - 14,36
$S = \sqrt{\frac{\Sigma_1^n \delta_i^2}{n-1}}$	Cu	7,56 ± 0,96	5,82 - 10,95	1,30 ± 0,16	1,00 - 1,88
	Cd	0,252 ± 0,060	0,141 - 0,431	0,043 ± 0,10	0,024 - 0,074
$E = \bar{x} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$	Mn	0,924 ± 0,103	0,625 - 1,281	0,158 ± 0,018	0,107 - 0,220
MG = mittlerer Gehalt	Fe	700,3 ± 89,8	462,6 - 911,8	119,9 ± 15,4	79,2 - 156,1
KB = Konzentrations-bereich	Mg	596,3 ± 60,5	482,5 - 816,5	102,2 ± 10,4	82,7 - 140,0

5.2. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Kupfergehaltes in Humanplazenten

Seit einigen Jahren steht mit der AAS eine Methode zur Bestimmung des Kupfers zur Verfügung, die wegen ihrer leichten und schnellen Durchführbarkeit, ihrer guten Präzision und ihrer niedrigen Nachweisgrenze den bis dahin hauptsächlich angewandten photometrischen Verfahren überlegen ist (110-115, 117, 119-121, 125, 132-141). Medizinische, biologische und viele andere Materialien werden heute routinemäßig mit Hilfe der AAS auf den Kupfergehalt untersucht.

Kupfer gehört zu den am leichtesten durch AAS bestimmbaren Elementen; denn einmal ist das Absorptionsspektrum relativ linienarm, und zum anderen treten Störungen durch begleitende Metallionen erst bei sehr großen Überschüssen auf (143). In der Graphitrohrküvette lassen sich noch etwa $2 \cdot 10^{-12}$ g Kupfer nachweisen. Die Bestimmung ist hier jedoch nicht so störungsfrei wie in der Flamme, da sich Kupfer nur bis etwa 900 °C verlustfrei thermisch vorbehandeln läßt, so daß es häufig nicht gelingt, die Matrix vollständig genug zu entfernen (100).

Die Analyse des Kupfers in biologischem Material mittels der flammenlosen AAS in der Graphitrohrküvette gewinnt heute immer mehr an Bedeutung (22, 108, 142). Wir haben hier erneut den Kupfergehalt von Humanplazenten mit Hilfe der FAAS bestimmt und mit den Ergebnissen der spektralphotometrischen Bathocuproinmethode verglichen.

Über die Bedeutung des Kupfers in biologischen Systemen haben wir im Abschnitt 4.1. ausführlich gesprochen. Tatsache ist, daß eine beträchtliche Menge an Informationen über das Kupfer bezüglich seiner Absorption, Exkretion und biochemischen Rolle vorliegt. Wie beim Zink und bei anderen Spurenelementen gibt es aber beim Kupfer große Wissenslücken hinsichtlich seiner Biochemie, Physiologie, Pathologie und seines Mengenvorhandenseins im menschlichen Körper (70, 74, 126, 131).

Methodik

Analysengerät, Materialien und Festlegung der Arbeitstechnik sind, wie berichtet, bei der Zinkbestimmung im Abschnitt 5.1. enthalten. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die FAAS-Bestimmung sind aus Tabelle 13 bzw. 14 zu ersehen.

Arbeitsvorschrift

Die Kupferbestimmung wurde ebenfalls im Routineverfahren durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der spektralphotometrischen Bathocuproinmethode (Referenzmethode) verglichen.

Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen wurden im Verhältnis (1+1) mit 0,01 N HCl verdünnt. Die Verwendung des Untergrund-Kompensators war wiederum nicht erforderlich, da die maximal anwendbare thermische Zersetzungsstufe für Kupfer vorgeschaltet war und somit die Probe weitgehend von störenden Begleitsubstanzen befreit wurde.
Reagenzien: Kupfer-Stammlösung = Titrisol (1 g $Cu.l^{-1}$)
Kupferlösungen = 25 bis 200 ppb Cu in Blindlösung.
Blindlösung = 0,2% Trinatriumzitrat-2-hydrat in 3%igen H_2SO_4 wurde im Verhältnis (1+1) mit 0,01 N HCl verdünnt.
Blindwert: vernachlässigbar.
Referenzmethode: Spektralphotometrie (Bathocuproinmethode).
Optimaler Arbeitsbereich: 0,25 - 175 ppb Cu (Standardkurve Abb. 13).

Den Kupfergehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 19 an. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und im Frischmaterial sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Resultate und Diskussion

Die Ergebnisse der FAAS-Bestimmung des Kupfergehaltes der normalen bluthaltigen Humanplazenta sind 7,3% höher als

die von uns mit der spektralphotometrischen Referenzmethode erzielten Mittelwerte: 7,56 $\pm$ 0,96 ppm Cu im Trocken- bzw. 1,30 $\pm$ 0,16 ppm Cu im Frischmaterial.

Der Einsatz der Graphitrohrküvette zur flammenlosen AAS-Bestimmung des Kupfergehaltes biologischer Materialien ermöglicht eine erhebliche Steigerung der Empfindlichkeit; doch ist ihr Einsatz keineswegs problemlos, sondern erfordert die Beachtung vieler Einzelheiten, da man sonst Gefahr läuft, verfälschte Ergebnisse zu erhalten.

Bei sauberem und exaktem Arbeiten läßt sich jedoch die Messung des Kupfergehaltes von biologischem Material mit Hilfe der FAAS sehr einfach, exakt und vor allem sehr schnell durchführen.

Tabelle 18 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der FAAS-Bestimmung von Kupfer in Humanplazente

Konzentrationen (ppb Cu)	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwerte (%)
25,0	3,6	3,8	3,7
50,0	7,7	7,5	7,6
75,0	11,0	11,0	11,0
100,0	14,5	14,3	14,4
125,0	17,7	17,1	17,4
150,0	21,8	21,6	21,7
175,0	24,6	25,4	25,0
200,0	30,7	30,7	30,7

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

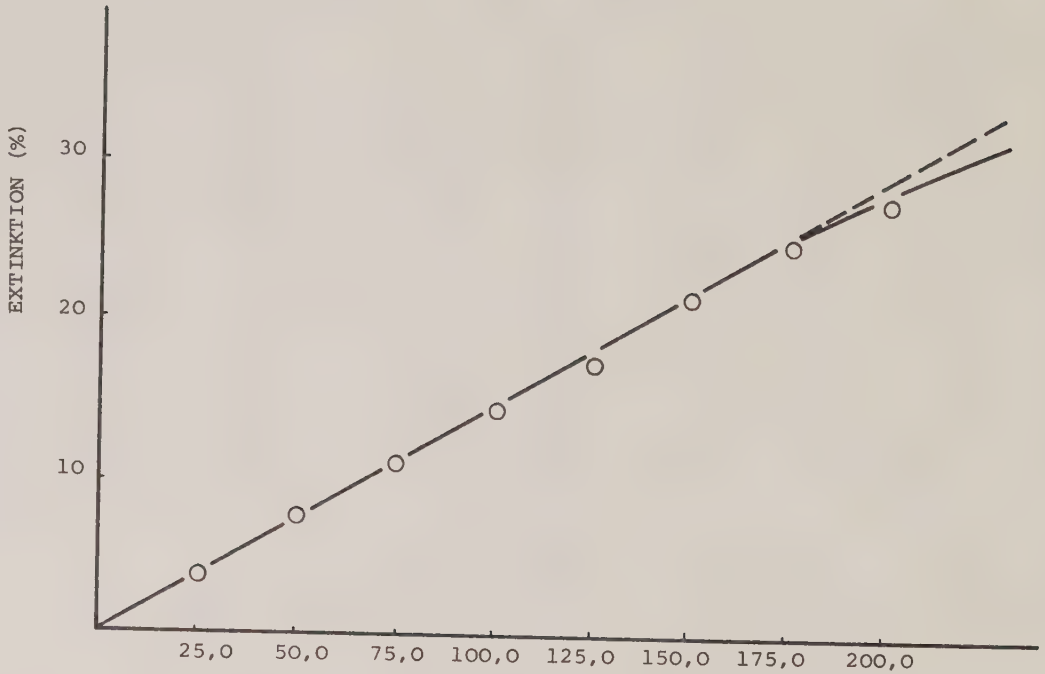

Abb. 13

Standardkurve der flammenlosen AAS-Bestimmung des Kupfergehaltes von menschlichen Plazenten

Tabelle 19 Kupfergehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Extinktionen (Mittelwerte)* (%)	Plazenta-Stamm-Lösungen (ppm Cu)		Trockenmaterial (ppm Cu)		Frischmaterial (ppm Cu)	
		Spekt.	FAAS	Spekt.	FAAS	Spekt.	FAAS
F	15,5	0,208	0,212	10,42	10,6	1,79	1,82
G	16,0	0,213	0,219	10,67	11,0	1,82	1,88
H	12,0	0,159	0,164	7,97	8,2	1,37	1,41
I	10,2	0,129	0,140	6,46	7,0	1,11	1,20
J	10,6	0,142	0,146	7,12	7,3	1,22	1,25
K	8,5	0,100	0,116	5,02	5,8	0,86	1,00
L	10,0	0,127	0,137	6,34	6,9	1,09	1,18
M	9,1	0,109	0,125	5,46	6,2	0,94	1,07
N	9,9	0,125	0,136	6,24	6,8	1,07	1,16
O	12,3	0,149	0,169	7,47	8,5	1,28	1,45
P	10,7	0,127	0,146	6,37	7,3	1,09	1,25
Q	11,4	0,142	0,157	7,09	7,8	1,22	1,34
R	10,7	0,147	0,147	7,37	7,3	1,26	1,26
S	11,1	0,140	0,152	7,00	7,6	1,20	1,30
T	10,8	0,130	0,149	6,52	7,4	1,12	1,27
U	10,5	0,134	0,144	6,68	7,2	1,14	1,24
V	10,3	0,141	0,141	7,03	7,0	1,20	1,21
X	8,6	0,114	0,118	5,71	5,9	0,98	1,02
Y	11,0	0,132	0,151	6,62	7,6	1,14	1,30
Z	11,2	0,154	0,153	7,69	7,7	1,32	1,32

* Mittelwerte von je drei doppelten Messungen
Spekt. = Spektralphotometrie

5.3. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Cadmiumgehaltes in Humanplazenten

In den letzten Jahren wurde Cadmium neben anderen Schwerelementen wiederholt im Zusammenhang mit umweltbelastenden Faktoren genannt. Es wird in sehr unterschiedlichen Mengen im Wasser, in der Luft, im Boden, in Lebensmitteln, in Pflanzen und Tieren gefunden, so daß man von einem ubiquitär verbreiteten Spurenelement sprechen kann (144).

Cadmium ist ein metallisches Element, das mit Zink und Quecksilber große Ähnlichkeit aufweist. Handelsübliches Zink ist gewöhnlich mit etwa 1% Cadmium kontaminiert, da es in der Natur meist in Begleitung von Zinkerzen vorkommt. Im Gegensatz zu dem nahe verwandten Zink hat Cadmium keine bekannte Funktion in biologischen Systemen, und im Hinblick auf die menschliche Gesundheit ist ihm große Beachtung beizumessen.

Die Kontamination unserer Umwelt mit Cadmium ist verhältnismäßig jungen Datums. Erst seit drei Jahrzehnten wird es verbreitet verwendet, so daß niedrige Spiegel bei älteren Leuten eine geringere Exposition im früheren Leben reflektieren könnten. Untersuchungen ergaben, daß nach Verabreichung an Versuchstiere das Cadmium aus dem Blut verschwindet und in verschiedenen Organen gespeichert wird, insbesondere in der Leber, ferner Nieren, Pankreas, Milz, Plazenta und Brustdrüsen.

Die zunehmende Verwendung des Metalls in der elektrolytischen Metallbeschichtung, in der Färberei, in der Produktion von Stabilisatoren, in der Herstellung von Legierungen, Akkumulatoren und sonstigen industriellen Erzeugnissen führt neben den Emissionen aus Hüttenindustrie, Feuerungs- und Müllverbrennungsanlagen, Autoreifenabrieb und Abfällen zu einer wachsenden Belastung unserer Biosphäre.

Chronische industrielle Cadmium-Vergiftungen sowie ihr Erscheinungsbild sind aus zahlreichen Berichten gut bekannt. Die typischen Symptome sind eine Entkalkung des Skeletts bzw. Leber- und Nierendysfunktion. Ein klassisches Beispiel

dafür ist eine in Japan aufgetretene Krankheit ("Itai-Itai"), von der man seit 1962 etwa 223 Fälle (davon mindestens 150 Todesfälle) registriert hat. Weitere Berichte über chronische Cadmium-Vergiftungen kamen aus der Industrie (Elektroplattierung, Galvanisierung, Akkumulator-Herstellung und Färbereien). Akute Intoxikationen erfolgten durch Cadmium-überzogene Eisschalen, Bratpfannen und andere Haushaltsgeräte oder durch Einatmen von Dämpfen in metallverarbeitenden Fabriken. Die Opfer einer akuten Cadmium-Vergiftung durch orale Aufnahme erholen sich gewöhnlich, während das Einatmen von Dämpfen meist tödlich ist. Die chronische Cadmium-Vergiftung führt in der Regel nach mehreren Jahren zum Tode.

Cadmiumverbindungen werden ferner für die Dekors von Porzellan- und Keramikgeschirr verwendet: Dieses Cadmium kann von der Geschirrglasur beim Kochen abgegeben werden, sich im Magen mit der Salzsäure zum giftigen Cadmiumchlorid umsetzen und in den Organismus eintreten. Eine weitere Kontaminationsquelle stellt das Rauchen dar: Die mittlere täglich inhalierte Menge beträgt etwa 3 µg Cd (145). Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen Nahrungs- und Getränkeverbrauchs in der BRD wurde eine gesamte Cadmiumbelastung von 48 µg/Tag pro Kopf berechnet (146).

Cadmium enthaltende Metallenzyme sind bis zur heutigen Zeit nicht beschrieben worden. In der Leber und den Nieren des Menschen wurde ein Protein nachgewiesen, das Cadmium, Kupfer und Zink bindet. Das Molekül enthält 26 Sulfhydrylgruppen, an die die Metalle durch Bildung von Mercaptiden gebunden werden (3). Da Cadmiumionen die Biosynthese des Metallothioneins aktivieren, wird diesem Protein eine Funktion bei der Bindung überschüssiger Cadmiummenge zugeschrieben. Dabei werden die schädlichen Cadmiumionen eingekapselt und nur sehr langsam wieder ausgeschieden.

Cadmium ist also ein typisches Kumulationsgift, das äußerst langsam aus dem Körper ausgeschieden wird: Die biologische Halbwertszeit beträgt 10 bis 30 Jahre. Neugeborene enthalten rund 1 µg Cd, während der erwachsene Mensch im Alter von

50 Jahren einen Gesamtkörpergehalt von 10 bis 30 mg aufweist; davon allein ein Drittel in der Niere (3,147). Das Ausmaß der Speicherung hängt von der Größe der Kontamination der Umwelt ab. In der BRD wurden bei Personen, die nicht gewerbsmäßig mit Cadmium in Berührung kamen, folgende Cd-Konzentrationen (bezogen auf das Feuchtgewicht) gefunden: Blut (0,01-0,07); Gehirn, Lunge, Herz, Muskel (0,01-0,45); Leber (0,10-3,90) und Niere (1,20-15,0) (in ppm).

Aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit kann das Cd besonders den Stoffwechsel von Zn und Cu, ferner von einer Reihe anderer Mineralstoffe (z.B. Fe, Mn, Se, Co, Ca, Mg, Na, K) negativ beeinflussen (3, 4, 73, 111, 147-150). Dem Studium seiner biologischen Rolle und der Verhinderung seiner toxischen Wirkung durch das Zn ("Antimetabolit") wird zur Zeit wachsende Aufmerksamkeit geschenkt. Außer Zn scheint noch das Se eine Schutzwirkung gegen die karzinogenen, teratogenen und hypertensinogenen Effekte des Cd zu haben (111).

Teratogene und karzinogene Wirkungen des Cadmiums lassen sich in Tierversuchen nur bei parenteraler Gabe, nicht aber bei anderen Zufügungsmethoden erzeugen. Die Applikationen von Cd an tragenden Ratten zu einem späteren Zeitpunkt der Trächtigkeit tötete die Feten über einen toxischen Effekt auf die Plazenta (151). Kleine Cd-Dosen verursachten Mißbildungen bei Hamstern während der ersten Tage der Trächtigkeit (152). Eine negative Korrelation zwischen dem Cadmiumgehalt der Plazenta und dem Geburtsgewicht der Kinder wurden vor kurzem nachgewiesen (153).

Es gibt Hinweise dafür, daß die Plazenta als biologische Schranke zur Verhinderung der Übertragung des Cadmiums von der Mutter auf den Fetus wirkt (154). Hat die Mutter einen hohen Cadmiumspiegel, so daß die Plazenta den Zustrom nicht mehr aufnehmen kann, dann tritt die fetale Leber in Aktion und schützt durch Aufnahme des Metalls die anderen Gewebe. Nur Stoffe, die die Plazentaschranke passieren, wirken auf den Keim ein. Gewisse synthetische Produkte, die in Haushalten verwendet werden, verändern die Verteidigungsgrenze der Gebär-

mutter und ermöglichen dadurch die toxische Wirkung des Cadmiums auf die Embryonen (73). Jedoch wird die Durchlässigkeit der Plazenta bei einem geschädigten Embryo bzw. Fetus verändert (11).

Es wird neuerdings behauptet, daß, da das Cadmium in Neugeborenen aufgrund der relativ unempfindlichen Analysenmethoden in älteren Untersuchungen nicht nachweisbar war, für Cadmium eine Plazentaschranke bestehe. Tatsächlich haben spätere Untersuchungen bewiesen, daß Cadmium während der Schwangerschaft im Embryo angereichert wird (155). Eine endgültige Aussage über diese Frage bleibt jedoch noch aus.

Thürauf und Mitarb. (156) untersuchten den Cadmiumgehalt von 179 Plazentan aus drei unterschiedlich industrialisierten Gebieten der BRD. Es ergaben sich zwischen den mittleren Gehalten der Plazenten aus dem Ruhrgebiet und denen des bayrischen Waldes signifikante Unterschiede (74,5 $\pm$ 24,4 μg zu 55,8 $\pm$ 21,6 μg Cd).

Thieme und Mitarb. (22, 24) untersuchten ebenfalls Plazenten aus drei süddeutschen Gebieten. Auch hier zeigte sich die niedrigste Konzentration in dem ländlichen Gebiet, die mittlere in einer Großstadt und die höchste in einem Gebiet mit Bleivorkommen. In den Plazenten mit den höheren Cadmiumgehalten wurden ebenfalls stark erhöhte Bleigehalte festgestellt. Ob hier ein Zusammenhang besteht, konnte nicht geklärt werden. Außerdem wurden im industriell stark belasteten Gebiet (Essen) signifikante Konzentrationserhöhungen des Cadmiums gefunden.

Mit Ausnahme weniger Arbeiten wurde bisher also kaum den Gefahren Beachtung geschenkt, die durch Schwermetalleinlagerung in der Plazenta und in fetalen Organen entstehen. Die dadurch induzierten Erkrankungen treten mit ihrer vielschichtigen Symptomatik bei Erwachsenen und beim Kind relativ häufig auf. Sie sind gerade beim Fetus mit seiner erheblichen Wachstumsgeschwindigkeit und seiner damit verbundenen Empfindlichkeit der Enzymsysteme gegen Schwermetalle vorhanden.

Die Nachfrage nach analytischen Daten von Cadmium ist in den letzten Jahren ständig gestiegen. Zur Überprüfung der verschiedenen analytischen Methoden und der Qualifikation der Analysendaten wurden in verschiedensten Gremien des In- und Auslandes Ringuntersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse waren häufig unbefriedigend (14, 157-158). Die Ursachen für solche unterschiedlichen Ergebnisse sind nicht zuletzt in der kritiklosen Anwendung moderner physikalisch-chemischer Verfahren bzw. der Bagatellisierung analytischer Schwierigkeiten zu suchen.

Für den Spurenanalytiker stellt sich zu Beginn jeder Analyse die Frage nach der Methode. Die Entscheidung richtet sich nach Art und Menge des verfügbaren Probenmaterials einerseits und nach den Eigenschaften des zu bestimmenden Elementes andererseits. Zur quantitativen analytischen Bestimmung von Cadmiumspuren in biologischen sowie in verschiedensten Materialien werden vorwiegend die spektralphotometrische Bestimmung mit Dithizon (144, 159) und Atom-Absorption-Methoden (21-22, 108, 110-111, 131, 137, 144, 157, 160-178) herangezogen. Daneben stehen noch die Polarographie bzw. Voltammetrie (159, 170, 179-180) und die Neutronen-Aktivierungs-Analyse (24, 159, 181-182) als Analysenmethoden im Gebrauch.

Man findet heutzutage in der Literatur eine Menge Arbeiten, die über verschiedene Analysentechniken für Cadmiumbestimmung in biologischen und vergleichbaren Materialien mittels AAS berichten: Flammentechnik (21, 110, 119, 131, 137, 144, 161, 168, 171, 172, 175), Graphitrohrverfahren (22, 108, 157, 160, 162-163, 165-167, 169-170, 173, 176, 178), Delves-System (177), Boot-Technik (111), Tantal-Ribbon-Verfahren (164), usw. Da Cadmium sehr leicht atomisierbar ist, läßt es sich mit der Boot-Technik und mit dem Delves-System gut bestimmen: Die Nachweisgrenzen für beide Verfahren liegen bei $1 \cdot 10^{-10}$ bzw. $2 \cdot 10^{-11}$ g Cd. In einer Luft-Azetylen-Flamme läßt sich Cadmium gut und ohne nennenswerte chemische Interferenzen bestimmen; eine Nachweisgrenze von $2 \cdot 10^{-3}$ ppm Cd läßt sich leicht erreichen. Allerdings ist in vielen Fällen

die Ausgangskonzentration nicht ausreichend, so daß zeitraubende Extraktionsvorgänge oft nötig sind.

In der Graphitrohrküvette gehört Cadmium mit einer Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^{-13}$ g zu den empfindlichsten Elementen. Die Bestimmung ist aber wegen der hohen Flüchtigkeit des Cadmiums besonders in Gegenwart komplexer Matrices schwierig, da die thermische Vorbehandlung nur bei relativ niedrigen Zersetzungsstufen verlustfrei durchgeführt werden kann. Außerdem liegt die Meßwellenlänge des Cadmiums (228,8 nm) sehr kurzwellig, und daraus lassen sich stärkere Störungen durch Rauch und Streulicht erwarten. Wie man daraus ersieht, ist eine Cadmiummessung in biologischem Aufschlußmaterial ohne Untergrundkompensator unmöglich. Eine angemessene Eichung ist ferner nur durch die Additionsmethode erreichbar.

Zur Cadmiumbestimmung in den Plazenta-Aufschlußlösungen scheint also die direkte flammenlose AAS-Bestimmung in der Graphitrohrküvette besonders geeignet zu sein, denn sie ist weniger umständlich und kontaminationsgefährdet als jede Kombination mit einer Extraktionsmethode. Ohne eine besonders gute Optimierung kann allerdings eine solche Direktbestimmung im ppb-Bereich nicht eingesetzt werden. Dafür sind eingehende Untersuchungen ins einzelne Voraussetzung.

Methodik

Analysengerät, Materialien und Festlegung der Arbeitstechnik sind, wie berichtet, im Abschnitt 5.1. nachzulesen. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die AAS-Bestimmung sind in Tabelle 13 bzw. 14 angegeben.

Bei einer Spuren- bzw. Ultraspurenanalyse muß sorgfältig darauf geachtet werden, daß die Metallgehalte nicht durch Adsorptionseffekte oder Kontamination (Chemikalien, Gefäße, Pipettenspitze usw.) verfälscht werden (183, 184). Besondere Aufmerksamkeit erfordern Polyäthylenflaschen und Pipetten-

spitzen aus Polypropylen, da eine gewisse Kontamination des Materials während des Herstellungsprozesses zu erwarten ist, wobei hauptsächlich Spuren von Cd, Zn, Fe und anderen metallischen Elementen zu erwähnen sind. Auch ein mehrmaliges Waschen mit verd. Salpetersäure kann diese Kontamination nicht immer ausreichend beseitigen. Hier wurde das Problem durch das Kochen der Pipettenspitzen in verd. Salpetersäure gelöst.

Wie schon erwähnt wurde, ist die Flüchtigkeit von Cadmiumverbindungen sehr groß. Die Anwesenheit von Schwefel- oder /und Phosphorsäure in der Bestimmungsprobe erschwert aber die Verflüchtigung des Cadmiums und erlaubt eine erhebliche Erhöhung der Zersetzungstemperatur (173, 185). Die Plazenta-Stammlösungen haben einen beträchtlichen Gehalt an Schwefelsäure und Phosphat, was die Anwendung einer hohen Zersetzungsstufe (Programm 5) ermöglicht hat.

Trotzdem reichte eine Veraschungstemperatur von ca. 490°C nicht aus, um das zugesetzte Trinatriumzitrat vollständig zu verflüchtigen. Überlagerung spezifischer und unspezifischer Absorptionen waren die Folge. Um die Wirksamkeit des Deuteriumkompensators zu erhöhen, wurden die Retentionszeiten von Cadmium- und Störsignal durch geeignete Atomisierungstemperatur auseinander geschoben.

Bei der Additionsmethode wurden zu den analysierenden Plazentalösungen schrittweise zusätzlich Cadmiumkonzentrationen zugegeben, und nach dem Durchmischen der Probe wurde der Metallgehalt bestimmt. Der Matrixeffekt ist für die jeweiligen Bestimmungen der gleiche gewesen. Trägt man die Analysenergebnisse gegen die jeweils zugesetzte Schwermetallkonzentration auf, so lassen sich die einzelnen Punkte durch eine Eichkurve verbinden, deren Extrapolation zur Abzisse (Konzentrationsachse) den ursprünglichen Cadmiumgehalt der Probe angibt. Nach der Additionsmethode kann zuverlässig nur gearbeitet werden, wenn sich die Meßwerte auf einer Geraden befinden (185, 186).

Arbeitsvorschrift

Da Cadmium in der Graphitrohrtechnik zu den empfindlichsten aber auch störfähigsten Elementen zählt, wurde es durch die Anwendung der Additionsmethode und Verwendung des Deuterium-Untergrund-Kompensators bestimmt. Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen sind im Verhältnis (1+1) mit 0,01 N HNO_3 verdünnt worden. Da man wegen der hohen Flüchtigkeit des Cadmiums störende Matrices durch hohe Veraschungstemperatur nicht beseitigen kann, muß unbedingt mit dem Untergrund-Kompensator gearbeitet werden. Das bringt aber keine Einbuße des Signal/Rauch-Verhältnisses mit sich, weil die Deuteriumlampe bei 228 nm starke Strahlungsintensität aufweist (187). Die Cadmiumextinktion ist stark matrixabhängig, so daß eine zuverlässige Standardisierung nur über Aufstockung erfolgen kann. Bei maximal anwendbarer Zersetzungsstufe für Cadmium in der vorliegenden Matrix (490°C) wurde kein Verlust beobachtet. Die Atomisierungstemperatur konnte so gewählt werden, daß Rauch- und Cadmiumpeak angemessen getrennt waren (166).

Reagenzien: Cd-Stammlösungen = Titrisol (1 g $Cd.l^{-1}$)

Cadmiumlösungen = 7,5, 15,0, 22,5 und 30,0 ppb Cd in 0,01 N HNO_3.

Blindlösung = 0,2% Trinatriumzitrat-2-hydrat in 3%igen H_2SO_4 wurde im Verhältnis (1+1) mit 0,01 N HNO_3 verdünnt

Blindwert: vernachlässigbar

Optimaler Arbeitsbereich: 0 - 15,0 ppb Cd (zugesetzte Konzentration, Abb. 14)

Den Cadmiumgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 21 an. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und im Frischmaterial sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Resultate und Diskussion

Über die bei der Cadmiumbestimmung in Plazenta-Aufschlußlösungen mit Hilfe der FAAS auftretenden Fehlermöglichkeiten und deren Eliminierung bei der Probenvorbereitung, besonders bei der Veraschung und Herstellung der Analysenlösungen sowie über Vortäuschung von Cadmium durch größere Mengen Lösungspartner wurde ausführlich diskutiert. Anhand der hier vorgestellten Analysentechnik wurde es möglich, den Cadmiumgehalt der Plazenta-Stammlösungen zuverlässig zu erfassen.

Durch die fortschreitende Industrialisierung und ihre Rückwirkung auf die Umwelt kommt der Mensch auf den verschiedensten Wegen (Luft, Wasser, Boden, Lebensmittel, Bedarfsgegenstände) mit schädlichen Elementen und Chemikalien in Berührung. Neben giftigen Bestandteilen von Abgasen, Rückständen von Pestiziden, Tensiden, Cancerogenen u.a.m. kommt der Mensch auch in Kontakt mit Schwerelementen wie Cadmium, Quecksilber und Blei. Die Umweltkontamination mit diesen Schadstoffen wird mit Sorge betrachtet, da der Mensch dafür ein Speichervermögen hat und sich bei Überschreitung sehr kleiner Grenzkonzentrationen toxische Wirkungen entfalten können.

Aufgrund der Insellage gilt dies besonders für Berlin (West). Die im Stadtgebiet vorhandenen Müllablagerungsflächen und Müllverbrennungsanlagen sowie der dichte Verkehr und die Industrieabgase und -abwässer tragen sehr stark zur Beeinflussung ihrer Umwelt bei. Da Cadmium in der Natur meist in Begleitung von Zinkerzen vorkommt und nicht ohne großen Aufwand quantitativ von Zink zu trennen ist, findet man es in den Staubablagerungen und in der Luft in der Nähe von Müllverbrennungsanlagen und der zinkverarbeitenden Industrie (147). Die Aufnahme dieses Schadstoffes durch Nahrung und Wasser steht aber bei nicht beruflich exponierten Personen gegenüber der pulmonalen Aufnahme im Vordergrund.

Der Cadmiumgehalt erwies sich signifikant höher als erwartet, was eine gewisse Schwermetallkontamination menschlicher Plazenten im Berliner Gebiet vermuten läßt, da sich die Umwelt

belastung mit Schwermetallen auch in der menschlichen Plazenta widerspiegelt (24). Die Bestimmung von Blei und Quecksilber, die wir bereits in demselben Aufschlußmaterial mit Hilfe eines Trennungsvorganges und der flammenlosen AAS durchgeführt haben, bekräftigt diese Vermutung. Allerdings sind die hier erzielten Mittelwerte (0,252 $\pm$ 0,060 ppm Cd im Trocken- bzw. 0,043 $\pm$ 0,010 ppm Cd im Frischmaterial) erheblich niedriger als die von Dawson et al. (21) und Thürauf und Mitarb. (156).

Die Einlagerung von Cadmium, das als das bedeutendste Umweltgift anzusehen ist, sowie anderer Schwermetalle im Plazentagewebe kann zu Schäden am Embryo führen, da mit einer Wechselwirkung dieses Elements und essentiellen Spurenelementen zu rechnen ist und außerdem z.B. in Anbetracht der hoch stoffwechselaktiven Plazenta zu einer Störung von Enzymsystemen führen kann. Die sich daraus ergebenden Gefahren für den Verlauf der Schwangerschaft und für die Entwicklung des Kindes sind derzeit noch nicht abzusehen.

Tabelle 20 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Eichkurve für Plazenta-Lösung F nach der Additionsmethode

Zugesetzte Konzentration (ppb Cd)	Extinktionen (%)			Mittelwerte (%)
-	4,6	4,5	4,3	4,5
3,75	10,2	10,3	10,5	10,3
7,50	15,0	15,6	15,5	15,4
11,25	20,0	20,4	20,2	20,2
15,00	24,0	23,8	24,5	24,1

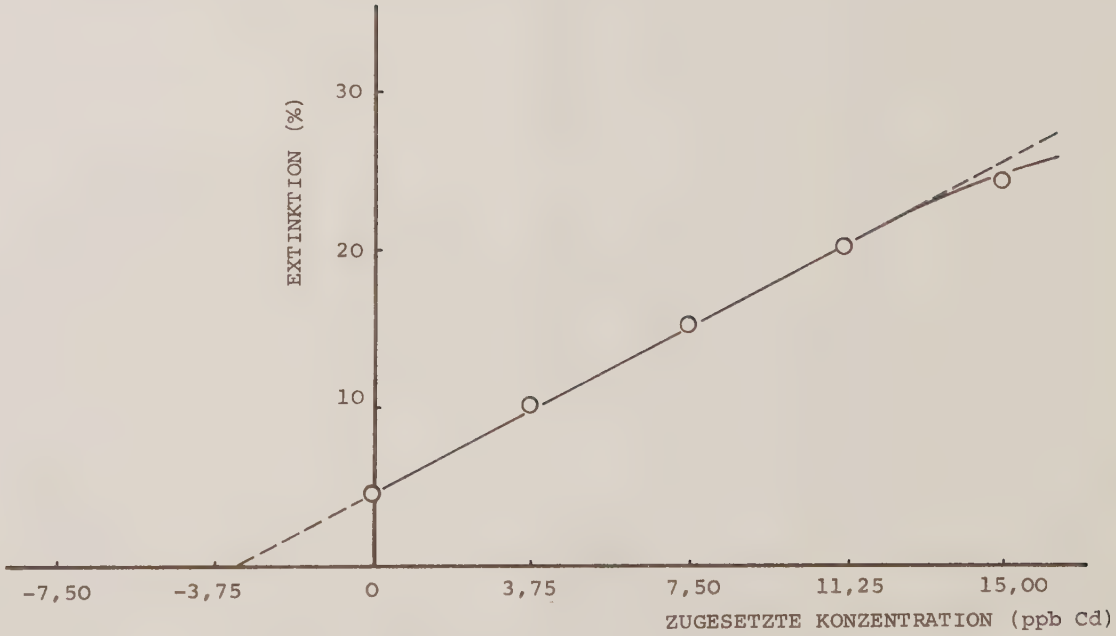

Abb. 14

Eichkurve für die FAAS-Bestimmung des Cadmiumgehaltes der Plazenta-Stammlösung F nach der Additionsmethode

Tabelle 21 Cadmiumgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Additionsverfahren (Ext. %)*					Einspritz -lösung (ppb Cd)	Plazenta -lösungen (ppb Cd)	Trocken- material (ppb Cd)	Frisch- material (ppb Cd)
F	4,5	10,3	15,4	20,2	24,1	3,08	6,15	307,50	52,71
G	4,2	9,6	14,0	20,8	23,0	2,81	5,62	281,25	48,21
H	3,7	10,1	15,1	20,3	24,2	2,55	5,10	255,00	43,71
I	4,3	10,4	15,4	21,0	24,5	2,85	5,70	285,00	48,85
J	4,0	9,5	14,5	19,9	23,6	2,74	5,48	273,75	46,92
K	5,8	12,4	17,2	23,7	27,2	3,71	7,42	371,25	63,63
L	5,5	11,7	16,5	22,0	25,0	3,82	7,65	382,50	65,56
M	3,8	11,0	16,1	21,6	25,1	2,53	5,06	253,12	43,39
N	2,3	9,0	14,5	19,2	24,5	1,50	3,00	150,00	25,71
O	2,6	8,7	14,0	19,0	22,1	1,88	3,75	187,50	32,14
P	2,0	8,2	13,3	18,9	23,2	1,41	2,81	140,62	24,10
Q	3,5	9,5	15,0	20,0	24,7	2,44	4,88	243,75	41,78
R	3,0	9,0	14,4	19,3	24,4	2,12	4,24	211,88	36,32
S	2,6	9,6	15,1	20,0	24,0	1,58	3,15	157,50	27,00
T	2,8	9,5	14,9	20,0	24,3	1,69	3,38	168,75	28,92
U	2,9	8,4	14,3	19,2	23,9	1,88	3,75	187,50	32,14
V	3,0	9,8	15,0	20,4	24,0	2,06	4,12	206,25	35,35
X	4,0	9,3	14,0	19,2	22,4	3,00	6,00	300,00	51,42
Y	5,7	9,3	14,5	18,4	23,8	4,31	8,62	431,25	73,92
Z	3,9	10,0	15,8	20,3	24,6	2,51	5,02	251,25	43,06

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

5.4. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Mangangehaltes in Humanplazenten

Seit 1931 gilt als erwiesen, daß Mangan zu den essentiellen Spurenelementen zu rechnen ist (74, 188-189). Schon 1939 berichteten Norris et al. über Ataxieerscheinungen infolge Manganmangel bei Ratten, Mäusen und Meerschweinchen. Beim Menschen wurde erstmalig 1972 von einem Manganmangel berichtet; bis zu jener Zeit wurde dies für unwahrscheinlich gehalten (74).

Bei Tierversuchen führt ein Manganmangel zu einem auffallenden Erscheinungsbild, u.a. zu schweren Störungen des Wachstums, der Knochenentwicklung, der Fortpflanzungsorgane und zur Ataxie des Neugeborenen. Die letztgenannte Erscheinung ist durch anomlale Entwicklung der Statolithen (Otolithen) des Bogengangapparates des Innenohres während des fetalen Lebens entstanden (70, 190).

Die Mangankonzentration in der Erdkruste und in den meisten Pflanzen ist wesentlich höher als die anderer Spurenelemente. Der menschliche bzw. tierische Körper ist hochselektiv bei der Zurückhaltung von Mineralien und enthält viel weniger Mangan als andere Elemente, deren Anwesenheiten in der Umwelt viel kleiner sind. Es muß also ein leistungsfähiger spezifischer Kontrollmechanismus der Mangankonzentration des Körpers vorhanden sein.

Der menschliche Organismus enthält ca. 10-40 mg Mn, und der Manganbedarf des Menschen wird auf etwa 0,02-0,03 mg/kg Körpergewicht geschätzt. Dieser wird nach heutigen Kenntnissen bei der üblichen Ernährung gedeckt, obwohl es sehr schwierig ist, eine mittlere tägliche Manganaufnahme genau festzustellen, da sie besonders von der Örtlichkeit und Natur der Diät abhängt. In der Regel ist aber eine tägliche Aufnahme von 20 µg Mn mehr als genug für die Erhaltung des Gleichgewichtes des Körpermetabolismus.

Die Humanmilch ist relativ arm an Mangan, und während der ersten Lebenswoche ist die Manganaufnahme des Kindes sehr gering (7 µg/Tag), was eine negative Manganbilanz erzeugt. Obwohl die Aufnahme während der frühesten Kindheit anscheinend sehr niedrig ist, bleibt die Mangankonzentration der Leber im Laufe des Lebens konstant. Es ist noch unbekannt, woher das Kind genügend Mangan für seinen Bedarf bzw. zur Einlagerung erhält.

Ein Interesse an der Berechnung des Mangangehaltes menschlicher Nahrung entstand erst, als nachgewiesen werden konnte, daß Manganmangel bei graviden Meerschweinchen zu einer reversiblen Verminderung der Glucosetoleranz führt. Bereits bekannt war der in-vitro-Effekt von Mangan auf die Glucoseaufnahme im Fettgewebe. Bewiesen sind noch die lipotropen Stoffwechseleigenschaften des Mangans und seine Rolle als Gegenspieler des hemmenden Effekts des Vanadiums auf die Cholesterinsynthese (69).

Obgleich Mangan ein kleiner Teil der gesamten Nutritionsproblematik ist, kann seine Bedeutung bei den Stoffwechselprozessen nicht genug betont werden. Trotz der beträchtlichen Aufmerksamkeit, die der Rolle des Mangans in vielen biologischen Funktionen zugewandt wird, bleibt seine spezifische biochemische Aktion "in vivo" praktisch unerforscht.

Das Mangan wirkt in einer Vielzahl von Enzymen als Kofaktor. Eine Reihe von Enzymen werden "in vitro" durch Mangan aktiviert, wobei diese Funktion auch von anderen zweiwertigen Kationen übernommen werden kann. Es gibt eine Vielzahl von Phosphatasen und phosphatübertragenden Enzymen, die sowohl vom Mangan als auch vom Magnesium aktiviert werden. Verschiedene Versuche haben gezeigt, daß die beiden Metalle sich nicht vertreten lassen und daß weder der Manganmangel durch Mg noch der Magnesiummangel durch Mn positiv beeinflußt wird. Am bekanntesten ist aber die Aktivierung der Arginase durch Mn^{2+}. Unbekannt bleibt noch, in welcher Weise das Mangan bei der Synthese der Proteoglykane wirkt.

Aufgrund seiner Aktivierungsfunktion besteht die Möglichkeit einer Beziehung zwischen enzymatischer Manganabhängigkeit

und Manganmangelzustand. Tatsache ist, daß eine Abnahme der Aktivität verschiedener Enzyme, vor allem der Arginase und der alkalischen Phosphatase, bei Manganmangel feststellbar ist. Verschiedene Metallionen sind im aktiven Enzymzentrum austauschbar, und da Mn^{2+} als Enzymaktivator fungiert, ist es wohl möglich, daß es mit anderen zweiwertigen Kationen ausgetauscht wird. Somit kann ein daraus folgender Manganmangel mit Effekten anderer Spurenelemente korreliert werden. Mangan ist z.B. am Kupferstoffwechsel aktiv beteiligt. Unter Bedingungen, bei denen ein höherer Manganbedarf entsteht (wie z.b. bei Schwangerschaft, Wachstum oder Diabetes), wird ferner eine Möglichkeit für das Eintreten eines Manganmangelzustandes gesehen. Auf alle Fälle ist die Annahme einer nahen Beziehung zwischen Mangan und verschiedenen Hormonen, Nukleinsäuren, therapeutischen Applikationen und biochemischen Hypothesen eine aktuelle Frage.

Im Gegensatz zum Manganmangel wurde die chronische Manganvergiftung ausführlich untersucht. Es zeigt eine extrem niedrige Toxizität bei Menschen und Tieren. Die gut funktionierende Homöostase des Mangans bewirkt, daß es ein relativ untoxisches Element ist und daß erst bei Zufuhr beträchtlicher Quantitäten oder nach langem Einatmen von großen Elementmengen schädliche Wirkungen entfaltet werden. Eine Vergiftung durch Nahrungsaufnahme scheint ausgeschlossen zu sein, es sei denn durch Auslösung einer industriell bedingten Kontamination.

Das aufgenommene Mangan erscheint sehr schnell in der Galleflüssigkeit und wird vollständig durch den Darm ausgeschieden. Meistens ist es nicht im Urin vorhanden. Die Ausscheidung durch die Galle bildet einen homöostatischen Mechanismus, welcher eine Überladung des Organismus mit Mangan verhütet (190).

In Körpergeweben ist Mangan sehr ausgiebig verteilt. Die höchste Mangankonzentration (3,5 ppm Mn in Frischgewicht) weisen die Knochen auf, gefolgt von der Hypophyse, Milchdrüse und Leber, die 1,3 ppm Mn enthalten. Die Lungen enthalten 0,4 ppm Mn, das Gehirn 0,1 ppm. In den Leberzellen befindet sich der größte Teil des Mangans in den Mitochondrien. Bei Versuchen

mit ^{54}Mn wurde auch eine Anreicherung von Mangan in den Zellkernen festgestellt. Das Plasma des Menschen enthält 0,18-0,31 ppm Mn, und zwar an ein spezifisches Protein (Transmanganin) gebunden. Die Erythrocyten sind mit 0,90-1,65 ppm manganreicher als die Blutflüssigkeit.

Mangan spielt neben Zink und Kupfer eine bedeutende Rolle in den Stoffwechselprozessen der menschlichen Plazenta. Seine Anwesenheit und die Ausübung seiner Funktionen sind sehr wichtig für den Verlauf der Gravidität und für die Entwicklung des Kindes.

Zur quantitativen Analyse von Manganspuren werden meistens spektralphotometrische und atomabsorptionsspektralphotometrische Methoden bevorzugt. Zur Bestimmung kleiner Mengen von Mangan wurde eine Reihe von spektralphotometrischen Methoden (191-197) ausgearbeitet, die größtenteils auf Oxydation des Mangans zu Permanganat herrühren. Die Auswertung erfolgt durch Messung der Permanganatfärbung selbst oder der Färbung der Reaktionspartner mit organischen Verbindungen, wie z.B. Diäthylanilin, Benzidin u.a. Die auf Messung der Permanganatfärbung basierenden Verfahren haben den Nachteil, daß sie für die Bestimmung kleiner Manganmengen im biologischen Material zu wenig empfindlich sind. Werden sie dennoch zu diesem Zweck angewendet, so ist eine ziemlich große Einwaage erforderlich (198). Andererseits können katalytische Methoden (199-200) mit Erfolg herangezogen werden. Sie dürften zu den empfindlichsten Analysenverfahren zählen und sind weitgehend selektiv. Eine vorherige, zeitraubende Abtrennung der zu bestimmenden Elemente ist dabei meistens unentbehrlich.

Besonders die Atomabsorptionsspektralphotometrie findet heute in der Bestimmung von Manganspuren in biologischen und verschiedenen anderen Materialien Anwendung. Es läßt sich ohne größere Störungen in einer Luft-Azetylen-Flamme bestimmen (100, 110, 112-113, 115, 119, 120, 174-176, 201-206). In der Graphitrohrküvette lassen sich noch 2.10^{-13}g Mn bestimmen, womit es mit zu den empfindlichsten Elementen gehört (100, 176, 207-

208). Da Mangan bis etwa 1000-1100 °C verlustfrei thermisch vorbehandelt werden kann, gelingt häufig eine weitgehende Matrixabtrennung und damit eine störungsfreie Bestimmung.

Methodik

Analysengerät, Materialien und Festlegung der Arbeitstechnik sind, wie berichtet, bei der Zinkbestimmung im Abschnitt 5.1. angegeben. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die FAAS-Bestimmung sind in Tabelle 13 bzw. 14 zu ersehen.

Arbeitsvorschrift

Das Mangan wurde ebenfalls durch Anwendung der Additionsmethode bestimmt. Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen wurden im Verhältnis (4+1) mit 0,01 N HCl bzw. den entsprechenden Manganlösungen gemischt. Obwohl die Anwendung maximaler thermischer Zersetzungsstufe für Mangan die Probe weitgehend von störenden Begleitsubstanzen befreite, war die Verwendung des Untergrund-Kompensators notwendig, um die vom zugesetzten Natriumzitrat und durch die Schwefelsäure hervorgerufenen unspezifischen Signale zu kompensieren.
Reagenzien: Mn-Stammlösung = Titrisol (1g $Mn.l^{-1}$)
Manganlösungen = 50, 100 und 200 ppb Mn in 0,01 N HCl
Blindlösung = 0,2% Trinatriumzitrat-2-hydrat in 3%igen H_2SO_4
Blindwert: zu vernachlässigen
Optimaler Arbeitsbereich: 0 - 40 ppb Mn (zugesetzte Konzentration, Abb. 15).

Den Mangangehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 23 an. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und im Frischmaterial sind in Tabelle 17 zusammengefaßt.

Resultate und Diskussion

Der Mangangehalt der normalen bluthaltigen Humanplazenta wurde zum ersten Male von Mischel (209) mittels eines alten spektralanalytischen Verfahrens bestimmt, und dadurch ist ein viel zu hoher Mittelwert (0,3 ppm Mn in Frischmaterial) erzielt worden. Neulich haben Thieme u. Mitarb. (24) in gefriergetrockneten Kotyledonen der menschlichen Plazenta aus dem umweltbelasteten Gebiet Essen durch FAAS einen Mangangehalt von 0,6 ppm erhalten.

Wir haben nun mit Hilfe der flammenlosen AAS in der Graphitrohrküvette und Anwendung der Additionsmethode 0,924 $\pm$ 0,103 ppm Mn in Trocken- bzw. 0,158 $\pm$ 0,018 ppm in Frischmaterial gefunden. Allerdings sind hier die genannten Mittelwerte für die gesamte Plazenta repräsentativ.

Die Manganbestimmung stellte sich als nicht so einfach wie erwartet heraus. Für die Untergrundkorrektur ist eine sehr gute Optimierung notwendig, um die Justierarbeit am AAS-Gerät in Grenzen zu halten. Immerhin läßt sich Mangan nach der hier beschriebenen Vorschrift in Geweben bzw. biologischen Materialien recht gut bestimmen.

Tabelle 22 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Eichkurve für Plazenta-Lösung F nach der Additionsmethode

Zugesetzte Konzentration (ppb Mn)	Extinktionen (%)			Mittelwerte (%)
-	12,0	12,3	11,4	11,8
10	16,4	16,0	17,0	16,5
20	22,8	23,3	23,0	23,0
40	28,3	28,8	29,0	28,7

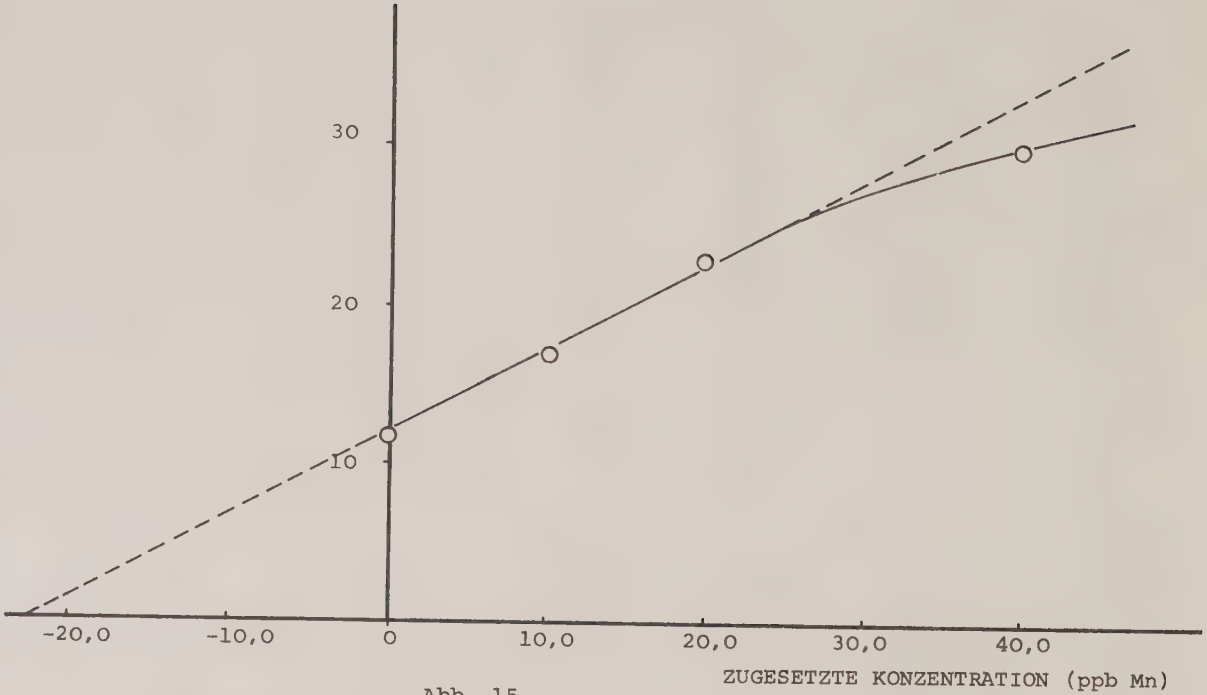

Abb. 15

Eichkurve für die FAAS-Bestimmung des Mangangehaltes der Plazenta-Stammlösung F nach der Additionsmethode

Tabelle 23 Mangangehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Additionsverfahren (Ext.%)*				Einspritz-lösung (ppb Mn)	Plazenta-lösungen (ppb Mn)	Trocken-material (ppm Mn)	Frisch-material (ppm Mn)
F	11,8	16,5	23,0	33,6	20,5	25,6	1,281	0,220
G	8,6	16,2	22,5	32,9	13,5	16,9	0,844	0,145
H	10,5	18,5	24,5	35,1	14,8	18,4	0,922	0,158
I	9,3	16,3	21,9	32,7	14,8	18,5	0,925	0,158
J	9,8	16,5	22,8	33,2	15,2	19,1	0,953	0,163
K	9,2	15,1	21,6	32,3	14,6	18,2	0,912	0,156
L	8,4	15,2	21,2	31,0	12,8	15,9	0,797	0,137
M	7,9	14,4	20,5	30,4	12,5	15,6	0,781	0,134
N	10,0	16,2	21,7	30,6	17,6	22,0	1,100	0,188
O	8,0	14,2	19,1	29,4	14,4	18,0	0,900	0,154
P	5,7	12,0	17,2	27,2	10,0	12,5	0,625	0,107
Q	8,0	13,3	18,0	26,7	16,2	20,3	1,015	0,174
R	7,2	12,7	17,6	26,5	14,2	17,8	0,891	0,153
S	7,1	12,4	16,9	24,0	14,2	17,8	0,888	0,152
T	6,0	10,5	15,5	23,0	13,5	16,9	0,844	0,145
U	6,4	11,3	15,4	22,3	14,0	17,5	0,875	0,150
V	6,8	10,8	14,5	19,9	17,5	21,9	1,094	0,188
X	5,1	8,5	11,4	16,8	14,8	18,4	0,922	0,158
Y	9,0	16,8	22,0	31,9	13,9	17,4	0,869	0,149
Z	10,8	17,0	23,9	33,5	16,8	20,9	1,047	0,179

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

5.5. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Eisengehaltes in Humanplazenten

Eisen ist das vierthäufigste aller Elemente und das häufigste Übergangsmetall auf der Erdoberfläche und in lebenden Organismen (3). Sein Metabolismus ist typisch für alle anderen Metalle dieser Reihe. Während Metallionen normalerweise mit Anionen reagieren können, weist Eisen (sowie Kupfer) die Besonderheit auf, daß es auch mit neutralen Molekülen wie Sauerstoff reagiert. Deshalb ist es Bestandteil des Hämoglobins, des für den Sauerstofftransport im Blut verantwortlichen Proteins. Aus historischen Gründen gehört das Eisen zu den klassischen Elementen, während es aber hinsichtlich seiner physiologischen Wirkung zu den Spurenelementen gerechnet werden muß.

Eisen hat im Organismus mehrere vitale Funktionen (190):

1. als Baustein der beim Elektronentransport in der Atmungskette beteiligten Cytochrome, von denen heute mehr als 20 bekannt sind; sie sind Eisenporphyrine, bei denen das zentrale Eisenatom durch den Valenzwechsel $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$ als Redoxsystem wirkt,
2. als Baustein der Peroxidasen und Katalasen, die Wasserstoff auf H_2O_2 übertragen und dadurch dem Organismus einen Schutz vor dem im Stoffwechsel anfallenden H_2O_2 verleihen. Auch sie sind Eisenporphyrine,
3. als Baustein der Oxygen-Transferasen, die aromatische Ringe an der Doppelbindung spalten,
4. als Baustein der Hydroxylasen (Monoxygenasen), die ein Sauerstoffatom zur Hydroxylierung verwenden, indem sie zur Bildung von H_2O das Sauerstoffatom mit einem Wasserstoffdonator reagieren lassen (mischfunktionelle Oxidasen); sie haben u.a. für Entgiftungsreaktionen des Organismus eine große Bedeutung,
5. als Baustein der beim Sauerstofftransport im Organismus beteiligten Eisenporphyrinverbindungen Hämoglobin und Myoglobin,
6. Als Baustein mancher Flavinenzyme, Succinodehydrogenase,

Aldehydoxidase, Xanthinoxidase, Cholinoxidase usw.

Das Neugeborene enthält etwa 200-300 mg Gesamtkörpereisen. Unter allmählicher Zunahme während des Wachstums erreicht der Eisenbestand beim Erwachsenen einen Wert von 3-5 g bzw. 45-60 mg Fe pro kg Körpergewicht. Das Gesamtkörpereisen ist auf verschiedene Fraktionen (Funktions-, Transport- und Depoteisen) verteilt: Mehr als 60% sind im Hämoglobin gebunden, 4,5% im Myoglobin und nur 2% in den verschiedenen Enzymen. Rund 10% des Körpereisens liegen in einer Form vor, die sich der genauen Analyse noch entzieht. Im Blutplasma erfolgt der Eisentransport in Bindung an das Protein Ferritin, in den Geweben liegt Eisen mit den Proteinen Ferritin und Hämosiderin als Speichereisen vor.

Der Eisenmangel ist der häufigste menschliche Nutritionsmangel (70). Die dadurch verursachte Anämie ist der auf der Erde verbreitetste Mangelzustand, da etwa 20% der Weltbevölkerung darunter leiden. Eine unzureichende Eisenzufuhr (durch mangelnde Nahrungszufuhr oder Resorption), ein erhöhter Eisenverlust (durch Darmblutungen bei Krebs oder Ulcera) oder ein erhöhter Bedarf in der Schwangerschaft und während des Wachstums kann zugrunde liegen. In der Kindheit ist oft eine unzureichende Zufuhr dieses Elementes vorhanden, da die Milch (sowohl Human- als auch Kuhmilch) relativ eisenarm ist. Die schlechte Verfügbarkeit dieses Metalls in einer Diät, die vorwiegend aus Getreideprodukten besteht, ist die größte Ursache menschlichen Eisenmangelzustandes. Obwohl endlose Diskussionen darüber geführt werden, bleiben verschiedene Aspekte des Eisenstoffwechsels unklar. Kontroversen über den Eisenbedarf, über den Begriff eines Eisenmangels und seiner Effekte und über die Bedingungen für eine Arzneimittelbehandlung dauern an.

Die wünschenswerte, tägliche Eisenzufuhr des Erwachsenen liegt bei etwa 12 mg. Bei stillenden, menstruierenden und schwangeren Frauen sowie während des Wachstums erhöht sich dieser Wert. Besonders in den letzten Monaten der Gravidität

wird eine erhöhte Eisenzufuhr benötigt (14 - 18 mg Fe pro Tag). Die früher als selbstverständlich erhobene Annahme, Eisen des Blut- und Muskelfarbstoffes, der Organe und verschiedener Pflanzen (Spinat) würde besonders leicht resorbiert, besteht nicht zu Recht. Untersuchungen mit markierten Lebensmitteln (^{59} Fe) zeigten, daß im allgemeinen weniger als 10% des enthaltenen Eisens resorbiert wurden. Fleisch ist aber die beste Quelle für Eisen nicht nur wegen der hohen Resorptionsquote, sondern auch deswegen, weil durch Fleisch die Ausnutzung des Eisens aus Cerealien und Vegetabilien verbessert wird. Im Gegensatz dazu hemmt eine phosphatreiche Nahrung die Eisenresorption ebenso wie Phytate (im Getreide) und Oxalate.

Die Resorption des Eisens zeigt manche Eigentümlichkeit, und ihr komplizierter Vorgang ist in Einzelheiten noch nicht geklärt. Sie erfolgt im Magen und vor allem wegen der großen Reaktionsfläche im Duodenum. Die Untersuchungen ihres Mechanismus wurden lange Zeit nicht weitergeführt, weil die von Hahn und Granick aufgestellte Hypothese des durch Ferritin vermittelten Mucosablocks nahezu allgemein als gesichert angesehen wurde. Nach langer Zeit mußte sie schließlich unter dem Druck vielfältiger Gegenargumente abgeändert werden.

Bei dem Eisenresorption-Mechanismus handelt es sich vermutlich um keine Energie verbrauchenden Prozeß, bei dem das Eisen nach Bindung an einen Liganden in Form eines Chelats resorbiert wird. Im Magensaft wurde ein Fe-bindendes Glycoprotein (Gastroferrin) nachgewiesen. In der Mucosazelle erfolgt wahrscheinlich auch eine Bindung des Eisens an ein Mucoproteid. Aus der Mucosazelle wird das Eisen durch einen energieabhängigen Prozeß in das Blut abgegeben, wo es an das Eisen transportierende Globulin Transferrin (Siderophylin) gebunden wird. Eisen, das nicht sofort an das Blut abgegeben wird, wird in der Mucosazelle als Ferritin gespeichert. Ungeklärt bleiben (jedoch) noch Einzelheiten des Eisentransportes durch die Epithelzelle, wie z.B. Lokalisation und Eigenschaften des energieabhängigen Transportsystems an der kapillarnahen Zellgrenze. Außerdem ist die Regulation der Eisenresorption

wie die Mucosazelle über den Eisenbestand des Organismus informiert wird.

Die schon seit einem halben Jahrhundert bekannte Verknüpfung von Eisen- und Kupferstoffwechsel ist durch die Einwirkung des kupferhaltigen Enzyms Ferrioxidase I (Ceruloplasmin) auf die Oxidation von zwei- zu dreiwertigen Eisen vor der Bindung an Transferrin zu erklären. Das Eisentransportprotein Transferrin ist ebenfalls ein heterogenes Glykoprotein, das elektrophoretisch mit dem β_1-Globulin wandert und pro Molekül zwei Atome dreiwertigen Eisens bindet.

Die Gesamtmenge an Eisen, die an Transferrin gebunden wird (TEBK - totale Eisenbindungskapazität), beträgt beim Menschen 280 - 400 µg Fe/100 ml. Das eisenfreie Tranferrin (UEBK - ungesättigte oder latente Eisenbindungskapazität) beträgt jedoch etwa 60 - 70%. Bei zahlreichen Erkrankungen können sich TEBK und UEBK sowie das Serumeisen in charakteristischer Weise verändern. Bei akuten oder chronischen Entzündungen, bei Infektionen oder Unterernährung fällt die TEBK unter die Norm oft mit gleichzeitiger Reduktion der Serumeisenkonzentration. Bemerkenswert ist allerdings die Zunahme der TEBK bei Eisenmangel.

Im Gegensatz zum Eisenmangel ist die Eisenüberladung des Organismus hinreichend erklärt worden. Eine Überladung des Organismus mit einem Stoff ist Folge einer gestörten Bilanz, die entweder durch eine übermäßige Zufuhr, oder eine verringerte Ausscheidung zustande kommt. Als Ursache für die Eisenüberladung des Organismus kommt jedoch nur eine erhöhte Resorption in Frage, da die Ausscheidung dieses Elementes sehr gering ist. Das überschüssige Eisen wird hauptsächlich als Hämosiderin im reticuloendothelialen System oder in den Parenchymzellen einiger Organe gespeichert (Hämosiderose, Hämochromatose). Bei Hämochromatosen kann der Gesamteisenbestand des Organismus von normalerweise 3 - 5 g auf 20 - 40 g erhöht sein.

Rund 70 - 90% des an Transferrin gebundenen Eisens werden durch die Erythrocytenvorstufen im Knochenmark für die Hämoglobinsynthese verbraucht, der Rest wird für die Biosynthese

von verschiedenen Enzymen und Coenzymen verwendet oder wandert in die Eisenspeicher ab. Der genaue Mechanismus des Eisenübertritts von Transferrin in die Biosyntheseprozesse ist noch unklar. Das nicht für die Biosynthesen verwendete Eisen wird erst als Ferritin (25 Gewichtsprozent Fe) abgelagert. Bei gesunden Erwachsenen beträgt das gespeicherte Eisen etwa 1,5g.

Das Eisen gehört zu den wenigen Elementen, die in nur äußerst geringen Mengen ausgeschieden werden (12 Jahre Halbwertzeit). Die Unfähigkeit des Organsimus, größere Eisenmenge auszuscheiden, gehört zu den Besonderheiten des Eisenstoffwechsels. Von großer Bedeutung ist auch der bei der Schwangerschaft eintretende Eisenverlust, der etwa 300 mg beträgt. Den größten Teil dieses Verlustes stellt dabei das dem Fetus über die Plazenta zugeführte Eisen dar, der durch Dauer der Gravidität, Größe und Zahl der Feten sowie deren Blutvolumen bestimmt wird. Hinzu Kommt der Blutverlust während der Geburt und der anschließenden Stillzeit (0,5mg Fe Verlust /Tag . Dieser Eisenverlust wird dadurch verringert, daß während der Schwangerschaft und auch noch einige Monate danach die Menstruationen ausbleiben.

Die hervorragende biologische Rolle des Eisens als integrierender Faktor der Bildung der Erythrocyten hat schon frühzeitig auch das Interesse der Embryologen wachgerufen(67). Da im Säugetierei nur wenig Eisen gespeichert werden kann, muß für die Blutbildung des Fetus Eisen von außen zugeführt werden. Die alten Embryologen bemühten sich daher, den Übergangsmechanismus in der Plazenta aufzuklären. Sie konnten tatsächlich das Eisen in Form von Hämosiderin in den Chorionzotten nachweisen. Die Eisenkörnchen lagen in der jungen menschlichen Plazenta in einem dichten Saum in den Basalteilen des Chorionepithels. Die Erythrocyten stellen eine weitere wesentliche Eisenquelle dar: Der Fetus erhält das Eisen, und das gilt besonders für die frühen Stadien der Gravidität, durch Zerstörung mütterlicher Erythrocyten und Abbau des Hämoglobineisens. Nach Ausbildung der Plazenta und der normalen plazentaren Durchblutung dürfte später diese Eisenquelle kaum noch ausreichen. Hier muß das Plasmaeisen als

Lieferant eintreten. Es wurde ferner bei Tierversuchen bewiesen, daß bei zu geringer Eisenzufuhr der Fetus einen Eisenmangel und Wachstumhemmung zeigt. Dabei sank der Eisenbestand der Mutter aber nie unter ein lebensnotwendiges Minimum ab; war jedoch dieses Minimum erreicht, so trat der intrauterine Fruchttod ein.

Radioaktives Eisen wurde schwangeren Frauen gereicht, und 10 Min. später wurde es im kindlichen Blut sowie in den kindlichen Organen widergefunden. Auf Grund dieser Befunde erschien es dann sehr unwahrscheinlich, daß dieses zeitlich so schnelle Auftreten des Eisens im Organismus des Neugeborenen über den Einbau in die Erythrocyten der Mutter, die Phagocytose in den Chorionzotten und die Hämolyse mit Freisetzung des Hämoglobineisens vor sich gehen sollte. Es wurde daher mit Recht angenommen, daß eine Versorgung des fetalen Organismus aus dem mütterlichen Plasmaeisen stattfindet, ohne daß jedoch der Weg der Eisenaufnahme durch die Plazenta wirklich aufgezeigt werden konnte. Da nach Gabe von radioaktivem Eisen im Tierversuch nach 40 Min. nur das Ferritin das radioaktive Eisen aufgenommen hatte, geht offenbar die Eisenaufnahme des Fetus über dieses Ferritin vor sich. Somit sind heute sowohl die Erythrocyten, als auch das Plasmaeisen als Eisenquelle der Plazenta und des Fetus gesichert.

Füttert man das Muttertier reichlich mit Eisen, kann bei momentaner Absättigung des fetalen Bedarfes die Plazenta Eisen speichern. Bei einem überhöhten Angebot wird auch durch die Plazenta vermehrt Eisen aufgenommen. Eine Aufnahmesperre erfolgt selbst bei Absättigung des normalen fetalen Bedarfes nicht; es verhält sich die Plazenta also anders als der Darm.

Mischel (67) bestimmte den Gewebseisengehalt der Humanplazenta indirekt als Differenz von Gesamt- und Bluteisen. Dabei fand er im Mittel 0,415 ppm Eisen im Plazentagewebe wieder. Der Gewebseisengehalt ist also, ebenso wie der Gesamteisengehalt, auffällig hoch. Die Plazenta fungiert also als Eisenspeicher. Im Gegensatz dazu enthalten Abortplazenten auffällig wenig Eisen, so daß der schon früher von vielen

Autoren vermutete Zusammenhang zwischen Eisenmangel und Fehlgeburt als möglich anerkannt werden mußte. Auch bei Totgeburten und pathologischen Plazenten wurde ein Zusammenhang bezüglich eines Eisenmangels angenommen.

Bei der biochemischen Analyse kommt normalerweise die Eisenbestimmung in Blut, Serum und Plasma in Betracht. Besonders die Eisenbestimmung im Serum bidelt, wie vorher erwähnt, bei gewissen Krankheiten ein wichtiges diagnostisches Mittel. Die meist angewendeten analytischen Methoden zur Eisenbestimmung in biologischen und verwandten Materialien sind die Spektralphotometrie (28-29,32,67,76,198,210-212), die Neutronen-Aktivierungsanalyse (23-24,213-214) und die Atom-Absorptions-Spektroskopie (u.a. 21-22,24,112-114,117-120,122,131,141,175-176).

Zur spektralphotometrischen Bestimmung des Eisens wurden zahlreiche Farbreaktionen herangezogen, deren Grundlage meistens die sogenannte "Ferroin-Reaktion", die auf der Bildung von rot gefärbten Fe^{2+} - Komplexen mit gewissen Heterozyklen basiert, bildet (198). Die meisten der erörterten Methoden sind sich in Bezug auf die Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit ziemlich ebenbürtig; recht erhebliche Unterschiede bestehen aber im Ausmaß der Störung durch andere Kationen und Anionen. Im Bereich derart niedriger Konzentrationen stoßen aber die meisten spektralphtometrischen Meßverfahren, die heute noch aus apparativen Gründen oft verwendet werden, an die Grenzen ihrer Leistungsfähigkeit. Dennoch sind sie zur Eisenbestimmung in Plazenten aufgrund des hohen Eisengehaltes recht gut anwendbar.

Die instrumentelle Aktivierunganalyse von biologischen Proben ist gegenüber anderen Matrizen enttäuschend, da durch den hohen Na-, K- und P-Gehalt viele Linien im γ-Spektrum überdeckt sind (219). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die sehr lange Wartezeit, die durch die Bestrahlungsdauer und Abklingzeit entsteht. Obwohl die NAA seit langer Zeit zur Analyse biologischer Proben angewendet wird, sind die Ergebnisse oft widersprüchig (213).

Eisen gehört zu den am häufigsten mit der Atom-Absorptions-Spektroskopie analysierten Elementen; es wird in einer

Vielzahl verschiedener Proben mit meist kleineren Gehalten bestimmt. Die Bestimmung von Eisenspuren in einer stöchiometrischen Luft-Azetylen-Flammen wurde oft als weitgehend störungsfrei bezeichnet, obwohl über zahlreiche physikalisch-chemische Störungen berichtet wird (100,112,114,117,141,175, 220).

In der Graphitrohrküvette lassen sich noch etwa 3 . 10^{-12} g Fe nachweisen. Die thermische Vorbehandlung kann je nach Matrix bis etwa 1000 - 1200 ^{o}C verlustfrei durchgeführt werden, so daß sich zahlreiche Begleitsubstanzen entfernen lassen. Die größten Störungen bei der Eisenbestimmung sind hierdurch Kontaminationen zu erwarten. Daher ist mit größter Sorgfalt zu arbeiten (100). Hohe Fremdsalzkonzentrationen führen zu mehr oder weniger starken Depressionen (101).

Da das Eisen in Plazenten in einem relativ hohen Gehalt anwesend ist, erscheint auf dem ersten Blick die Flammen-AAS besser geeignet als die FAAS. Dennoch ein höherer Gehalt an das zu untersuchende Element bedeutet auch eine Möglichkeite zur starken Verdünnung der Probenlösung, was u.a die Einflüsse dritter Partner ausschalten kann (103). Es ist eine Tatsache, daß die AAS mit flammenloser Anregung, speziell im Fall von Eisen und anderer bestimmter Matallspuren nur dann optimal eingesetzt werden kann, wenn das zu bestimmende Element in isolierter Form in schwach saurer Lösung vorliegt (101).

Methodik

Analysengerät,Materialien und Festlegung der Arbeitstechnik sind wie berichtet bei der Zinkbestimmung im Abschnitt 5.1 . Besondere Aufmerksamkeit wurde hier auf die Reinigung von Pipettenspitzen geschenkt, indem man sie in verdünnter Salpetersäure kochen ließ und anschließend mit demineralisiertem, destilliertem Wasser angemessen gespült hat. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die FAAS-Bestimmung sind in der Tabelle 13 bzw. 14 angegeben.

Arbeitsvorschrift

Die Eisenbestimmung wurde im Routineverfahren durchgeführt.
Zur Prüfung ihrer Richtigkeit ist ein Wiederfindungsrate-Test angewendet worden. Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen wurden im Verhältnis (1+120) mit 0,01 N HCl verdünnt. Die hohe Verdünnung gestattete eine störungsfreie Analyse mit der Graphitrohrküvette bei maximal thermischer Zersetzungsstufe für Eisen in der vorliegenden Matrix. Die Verwendung des Untergrund-Kompensators war nicht erforderlich, zumal die eingespritzte Probelösung weitgehend von störenden Matrix-Effekten befreit worden ist.
Reagenzien: Fe-Stammlösungen = Titrisol (1 g Fe. l^{-1}).
Eisenlösungen = 25 bis 250 ppb Fe in Blindlösung.
Blindlösung = 0,2 % Trinatrium-2hydrat in 3% igen H_2SO_4 wurde im Verhältnis (1+120) mit 0,01 N HCl verdünnt.
Blindwert: vernachlässigbar.
Optimaler Arbeitsbereich: 25 - 250 ppb Fe (Standardkurve Abb.16).

Der Eisengehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 26 wieder. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und im Frischmaterial sind in Teabelle 17 zusammengefaßt und das Ergebnis des Wiederfindungsrate-Tests zeigt Tabelle 25.

Resultate und Diskussion

Der Eisengehalt der normalen bluthaltigen Humanplazenta wurde zuerst von Mischel (67) mittels der kolorimetrischen o-Phenanthrolinmethode untersucht und ein Gesamteisengehalt von 111,1 ppm im Frischsubstanz gefunden. Danach fanden Dawson u. Mitarb. (21) mit Hilfe der Flammen-AAS u.a. einen Eisengehalt von $16,11 \pm 13,88$ μMol.g^{-1} (Trockengewicht) in reifen menschlichen Plazenten. Neulich haben Thieme u. Mitarb. unterschiedliche Spurenelement-Zusammensetzungen in Humanplazenten von verschiedenen Gebieten der Bundesrepublik erzielt.

Allerdings wurden hier die Analysen in gefriergetrockneten Plazentakotyledonen durchgeführt un die Werte sind deswegen nicht für die gesamte Plazenta repräsentativ. In den Gebieten Münchem, Bayerischer Wald und Altötting wurden mittels FAAS folgende Mittelwerte ermittelt: 569,6,523,5 bzw. 566,0 ppm Fe (22). Für dieselben Regionen sind durch NAA beträchtliche Abweichungen von denen mittels FAAS-ermittelten Mittelwerten erhalten worden: 1434, 1084 bzw. 1630 ppm Fe (24). Schließlich sind ebenfalls in gefriergetrockneten Plazentakotyledonen aus dem Großraum Essen ein Mittelwert von 900 ppm Eisen durch NAA und AAS ermittelt worden.

Wir haben durch Anwendung der flammenlosen AAS in Routineverfahren einen Eisengehalt von 700,3 $\pm$ 89,8 ppm im Trocken- bzw. 119,9 $\pm$ 15,4 ppm im Frischmaterial von normalen bluthaltigen Humanplazenten aus dem Raum Berlin (West) gefunden. Im Vergleich mit den sehr heterogenen Literaturangaben ist keine hochsignifikante Abweichung festzustellen.

Die hohe Konzentration des Eisens erlaubte eine ebenso hohe Verdünnung der Plazenta-Stammlösungen und damit wurde u.a. der Einfluß dritter Partner bei der Bestimmung soweit ausgeschaltet, daß er nicht mehr nachweisbar war. Somit haben wir das zu bestimmende Element geradezu in idealer Form zur Analyse in der Graphitrohrküvette gebracht. Die Richtigkeit der Bestimmung ist mit Wiederfindungsraten zwischen 105,6 und 93,7 % geprüft worden (Tabelle 25).

Tabelle 24 · Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der FAAS-Bestimmung des Eisens nach der Routineverfahren

Standard-lösungen (ppb Fe)	Mittlere Extinktionen* (%)			Mittelwerte (%)
25	3,5	3,4	3,6	3,5
50	5,5	6,1	6,2	5,9
75	8,3	8,0	8,1	8,1
100	11,5	11,0	11,2	11,2
150	14,5	15,0	15,1	14,9
200	19,4	18,5	19,5	19,1
250	23,5	23,2	23,3	23,3

* Mittlere Extinktionen von je zwei Messungen

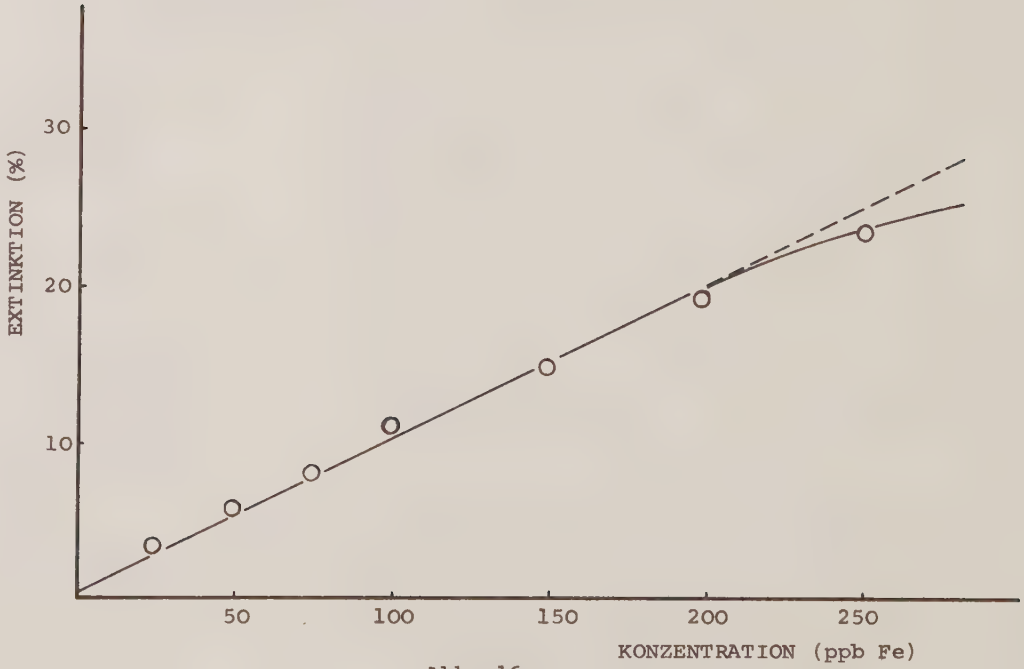

Abb. 16

Standardkurve für die FAAS-Bestimmung des Eisengehaltes nach dem Routineverfahren

Tabelle 25 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Lösungen	Zusatz (ng $Fe.ml^{-1}$)	Gesamter Eisengehalt (ppb)	Wiederfindungsrate (%)
A	-	165,1	-
A (50%)	-	82,6	101,9
A (50%)	50,0	132,6	104,1
A (50%)	100,0	182,6	105,6
A (50%)	200,0	282,6	93,7

Tabelle 26 Eisengehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwerte (%)	Einspritz-lösung (ppb Fe)	Plazenta-lösungen (ppm Fe)	Trocken-material (ppm Fe)	Frisch-material (ppm Fe)
F	6,8	7,0	6,9	76,5	9,25	462,58	79,21
G	8,3	8,8	8,6	95,3	11,53	576,54	98,72
H	8,4	8,3	8,4	93,1	11,26	563,14	96,43
I	11,0	10,5	10,8	119,7	14,48	724,03	123,98
J	9,2	8,9	9,0	99,7	12,07	603,36	103,32
K	13,1	12,4	12,8	141,8	17,16	858,11	146,94
L	11,0	10,2	10,6	117,5	14,21	710,62	121,68
M	10,3	8,9	9,6	106,4	12,87	643,58	110,20
N	10,5	10,8	10,6	117,8	14,25	712,57	122,02
O	9,3	8,8	9,1	100,8	12,20	610,06	104,46
P	12,3	10,5	11,4	126,3	15,28	764,26	130,87
Q	8,5	8,5	8,5	94,2	11,40	569,84	97,58
R	8,3	9,8	9,1	100,8	12,20	610,06	104,46
S	12,0	12,8	12,4	137,4	16,63	831,30	142,34
T	11,3	12,5	11,9	131,9	15,96	797,78	136,61
U	13,4	12,7	13,0	144,0	17,43	871,52	149,23
V	10,5	9,5	10,0	110,8	13,41	670,40	114,80
X	11,4	11,3	11,4	126,3	15,28	764,26	130,86
Y	10,5	11,8	11,2	124,1	15,02	750,85	128,57
Z	13,5	13,6	13,6	150,7	18,24	911,75	156,12

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

5.6. Anwendung der Flammen-Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Magnesiumgehaltes in Humanplazenten

Obwohl Magnesium kein typisches Spurenelement ist, wird es auf Grund seiner wichtigen Rolle als Mineralnahrung so angesehen (4).Als Bestandteil an zahlreichen Enzyme und Coenzyme ist es ein unentbehrlicher Bestandteil des lebenden Organismus.

Die Hauptaufgabe des Magnesiums im Organismus ist die Aktivierung nahezu aller Enzyme, die beim Umsatz von ATP bzw. den anderen energiereichen Phosphate UTP,GTP,ITP, beteiligt sind (190). Diese Funktion hängt mit der Neigung des Magnesiums zur Komplexbildung mit Phosphaten zusammen und drückt sich auch in einer Beteiligung des Metalls an alle ATP-abhängigen Reaktionen und der Pyrophosphatasereaktion aus (221). Magnesium ist daher ein wesentlicher Faktor bei der Muskelkonzentration und bei der Übertragung der Erregung von Nerven auf den Muskel. Ferner ist das Magnesium bei der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, an verschiedenen Stufen der Proteinbiosynthese im Cytosol un der Nukleinsäurebiosynthese im Kern beteiligt (3).

Im Stoffwechsel bestehen enge Beziehungen zwischen Magnesium, Calcium und Phoshat. Magnesium und Calcium üben zum Teil synergistische, zum Teil antagonistische Wirkungen im Stoffwechsel und auf verschiedene Körperfunktionen (z.B. auf die neuromuskuläre Erregbarkeit bzw. auf die Verkalkung des Knochengewebes) aus. Die zentrale Stellung des Magnesiums im Stoffwechsel bedingt, daß ein schwerer Magnesiummangel rasch zu dramatischen und lebensbedrohenden Ausfallerscheinungen führt.

Der Gesamtorganismus des Menschen enthält etwa 21 - 28 g Mg, davon 11 g im Skelett und 6 g im Muskel. Es ist

ein vorwiegend intrazelluläres Ion: die Mg-Konzentration in der Zelle beträgt das Fünf- bis Zehnfache des Wertes in der extrazellulären Flüssigkeit (222). Der Blutgehalt beträgt 0,8 - 1,0 mMol Mg. l^{-1}. Von dem im Plasma befindlichen Magnesium liegen 55% als freie Mg^{2+} - Ionen vor, 32% sind an Proteine gebunden, 3% liegen als Komplex mit Phosphat vor, 4% als Komplex mit Zitrat und 6% in Form nicht identifizierter Komplexe. Der normale Magnesiumgehalt des Plamas ist aber größeren unerklärlichen Schwankungen unterworfen.

Der Magnesiumbedarf des Menschen ist nicht bekannt, er dürfte bei 260-295 mg pro Tag liegen. Er hängt nicht nur vom Gesundheitszustand, sondern auch von der Zusammensetzung der Nahrung, deren Calcium- und Proteingehalt ab. Bei üblicher Ernährung werden etwa 0,3 - 0,5 mg Mg pro Tag aufgenommen. In jüngster Zeit mehren sich die Hypothesen, daß der Magnesiumbedarf des Organismus höher ist als vermutet. Gleichzeitig besteht der Verdacht, daß der Gehalt der Nahrung an Magnesium infolge der üblichen Düngunsmethoden in Abnehmen begriffen ist(69). Ferner ist der Magnesiumgehalt der Zelle oft aus ungeklärten Gründen erniedrigt, der Magnesiumbedarf des Körpers andererseits unter physiologischen, auch diätetischen Situationen erhöht, insbesondere durch Änderungen im Calcium-, Phosphor- oder Vitamin-D-Haushalt.

Magnesium ist vorwiegend ein Stuhlion und wird zu etwa 7o% mit den Faeces ausgeschieden. Die Resorption dieses Elements erfolgt über einen noch unbekannten Mechanismus durch die Dünndarmmucosa, in geringeren Mengen auch im Magen, nachdem das Magnesium des Pflanzen-Chlorophylls durch Salzsäure abgespalten worden ist. Eine Hemmung der Magnesiumresorption wird durch Calcium, Pyridoxin-Mangel, proteinreiche Kost und Alkohol verursacht.

Spontane Magnesium-Mangelsituationen sind bei normaler Ernährung und beim gesunden Meschen nicht zu erwarten. Sie erscheinen meistens als Folge einiger im Untergrund liegenden Krankheiten mit verschiedenen Symtomen und Zeichen, von denen einige im Zusammenhang mit Magnesiumverlusten stehen.

Solche Bedingungen schließen chronische Malabsorptions-Syndrome, schwere Diarrhoe, chronische Nierendisfunktionen, chronischen Alkoholismus und Protein-Energie-Mangelernährung ein (4). Oft kann ein Magnesiummangel bei denjenigen Zuständen auftreten, die eine erhöhte Magnesiumzufuhr bedürfen (Schwangerschaft, Laktation usw.). Auch die Beeinträchtigung der renalen Reabsorption von Magnesium kann einen Mangelzustand herbeiführen (3). Die Symtome sind nervöse Störungen mit Schwindelzuständen, Kribbeln in Händen und Füßen, die oft jahrelang als vegetative Dystonie verkannt werden und sich mit der Funktion des Magnesium bei der Erregungsübertragung erklären lassen.

Bei jüngeren Tieren bewirkt ein Magnesiummangel Wachstumsstörungen, Freßunlust, Durchfälle und Tod (223). Magnesiumfreie Kost erzeugt eine Erweiterung der Blutgefäße, Anstieg des Blutvolumens, Wachstumstillstand, Durchfälle, Haarausfall, Ödeme, Neigung zu Krampfanfällen und Kachexie. Außerdem bewirkt es vasodilatatorische Übererregbarkeit, Herzarrhythmien, tonisch-klonische Krämpfe und Vermehrung der Cholesterinester. Tritt der Tod ein, dann ist der Magnesiumbestand des Körpers bis auf 2/3 des normalen gesunken. Auf der Ebene der Zelle müssen komplexe Regulationsvorgänge existieren, da beim Magnesiummangel ein deutlicher Abfall der Serumkonzentration eintritt, während die Mg Spiegel in Zellen und Knochen nahezu unverändert bleiben. Wie die Zelle Magnesium akkumuliert, steht noch nicht fest. Magnesium ist andererseits wenig toxisch, und rein alimentär bedingte Schäden durch vergrößerte Magnesium-Zufuhren wurden nie beobachtet.

Ein durch Nahrung bedingter Magnesiummangel bei Ratten ist während der Trächtigkeit mit einer entsprechenden Erniedrigung der Magnesiumkonzentration des Plasmas verbunden. Tod des Fetus und Abnormalitäten waren die Folge (128). Magnesium ist durch die Eigenschaft bekannt, wechselseitig mit anderen vielzähligen Elementen zu wirken. Die Beziehung zwischen Mg und Ca ist beispielsweise gut bekannt. Die

Wechselwirkung mit anderen Spurenelementen erweckt den Verdacht, daß die nachfolgenden Abnormalitäten eines Mg-Mangel-Zustandes durch indirekte Effekte mineraler Wechselwirkungen statt direkte Effekte des niedrigen Magnesiumgehaltes des mütterlichen Plasmas des sich entwickelnden Embryos zustande kommen.

Der Magnesiumbedarf ist in der Schwangerschaft und der Laktationsperiode erhöht. In der Geburtshilfe hat man dem Magnesium als Therapeuticum schon frühzeitig Beachtung geschenkt (z.B. bei der Behandlung von Spättoxikosen). Die Kenntnisse des Wirkungsmechanismus hier sowie im Magnesiumstoffwechsel sind im allgemeinen sehr lückenhaft. Verschiedene Befunde bestätigen nach Mischel (223) die Richtigkeit der Magnesiumtherapie und unterbauen die schon lange klinisch beobachtete gute Wirkung des Magnesiumsulfates bei Plazentatoxikosen. Es scheint, als ob diese klinischen Erfolge durch eine Normalisierung des Magnesiumgehaltes in der Plazenta und in den mütterlichen Geweben zustande kommen.

Die normale, reife, bluthaltige menschliche Plazenta enthält wenige Magnesium (223) . Lediglich das Blutserum, die Blutzellen, der Darm und die Lunge enthalten noch weniger. Die übrigen Organe weisen meist ein Vielfaches des Mg- Gehalts der Plazenta auf. Mischel bestimmte den Mg-Gehalt des Gewebes der blutfreien Plazenta indirekt, indem er gleichzeitig den Blutgehalt und den Ionenanteil des Magnesiums im Blute ermittelte. Somit ergab sich ein echter Mg -Gehalt von 94 ppm im frischen Gewebe. Der Blutgehalt beeinflußt den Magsiumgehalt nur unbedeutend. In der unreifen Plazenta nimmt der Magnesiumgehalt mit der Differenzierung des Gewebes zu und liegt am Ende der Zeit um 3o% höher als zu Beginn der Schwangerschaft. Finden sich in der Plazenta reichlich Kalkinkrustationen, so steigt auch der Magnesiumgehalt auf übernormale Werte an. De Jorge et al. (224) haben auch große Unterschiede in der Magnesiumkonzentration von"normalen" und " verkalkten " Humanplazenten festgestellt. Im Gegensatz zu anderen Autoren fand Becker (225) keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mg-Konzentrationen von tierischen (Perd,Schaf,Rind) und menschlichen Plazenten.

Ferner weist er darauf hin, daß bei der Ermittlung des Mineralstoff-Bedarfs während der Trächtigkeit bei strikter Anwendung einer faktoriellen Methode neben den im Fetus erscheinenden Mineralstoffen diejenige Menge mitberücksichtigt werden muß, die in den Flüssigkeiten und in der Plazenta im Zusammenhang mit der Geburt ausgeschieden werden. Im Vergleich zu den Mengen der Neugeborenen dürften jedoch die mit der Plazenta ausgeschiedenen Mengen an Magnesium und anderen Spurenelementen unbedeutend sein.

Schließlich stellten Dawson et al. (21,226) fest, daß die jahreszeitlichen Schwankungen der monatlichen Magnesium- bzw. Eisenkonzentration mit einer entsprechenden Anfällikeit von Plazentatoxemie gut übereinstimmen. Der Magnesiumgehalt von toxemischen Plazenten sind signifikant höher als der der normalem.

Die erhebliche Aufmerksamkeit, die der Bestimmung kleiner Magnesiummengen im biologischen Material zugewandt wird, erklärt sich durch die Wichtigkeit dieses Elements. Die Bestimmung des Magnesiumspiegels in Körperflüssigkeiten und Organen ist für das Studium biochemischer Prozesse im lebenden Organismus von großer Bedeutung. Dabei werden fast hauptsächlich spetralphotometrische Methoden angewendet. Komplexometrische Titrationsmethoden sind infolge der relativ hohen Konzentration des Magnesiums in biologischen Materialien oft noch gut anwendbar.

Die photometrischen Methoden der Mg-Bestimmung beruhen größtenteils auf der Bildung von Farblacken mit gewissen Verbindungen aus der Gruppe der gelben Thiazol-Farbstoffe und auf der Bildung eines Farbkomplexes mit Eriochromschwarz T. Außer diesen direkten Methoden werden häufig auch indirekte Verfahren angewandt, bei denen das Magnesium in Form des Ammoniummagnesiumphosphates gefällt und der Phosphatgehalt des Niederschlags photometrisch bestimmt wird (198). Die sonstigen Methoden fanden in der Praxis keine weitere Geltung.

Magnesium gehört zu den am häufigsten mit AAS bestimmten Elementen, was sicher teilweise auf die sehr hohe Empfindlichkeit zurückzuführen ist, die für dieses Element erreicht werden kann (100). In der Graphitrohrküvette lassen sich noch etwa 1.10^{-12}g Mg nachweisen, jedoch ist die Bestimmung wegen der außerordentliche großen Kontaminationsgefahr schwierig, so daß bislang nur wenig darüber berichtet wurde.

Auf der 285,2 nm-Resonanzlinie beträgt die reziproke Empfindlichkeit mit einer Luft-Azetylen-Flamme 0,01 $\mu g.ml^{-1}$. $1\%^{-1}$, und es lassen sich wegen des günstigen Signal-Rausch-Verhältnisses Mg-Konzentrationen von 0,1 ppb gut erzielen. In einer laminaren Luft-Azetylen-Flamme scheint Mg weitgehend frei von chemischen Interferenzen zu sein. Zahlreiche Untersuchungen machen klar, daß bei Verwendung dieser Flamme höchstens höhere Gehalte an Silicium und Aluminium die Mg-Bestimmung etwas stören, daß aber keine Phosphat-Interferenz, nicht einmal bei höchsten Gehalten, zu erwarten ist. Durch Zugabe von La oder Sr zur Analysenlösung kann die Störung von höheren Al- Konzentrationen vermieden werden (112,114, 120,122,128,141,227-229). Die Mg-Bestimmung in biologischen und organischen Materialien wird also fast ausschließlich mittels der Flammen-AAS durchgeführt (u.a. 21,24, 112-114, 120,122,130,132,141,225,226,229-232).

Methodik

Analysengerät,Materialien und Festlegung der Arbeitstechnik wurden im Abschnitt 5.11 besprochen. Die Geräteeinstellung für die Bestimmung des Magnesiums mittels der Flammen-AAS ist in Tabelle 27 angegeben.

Arbeitsvorschrift

Das Magnesium wurde ebenfalls im Routineverfahren in einer reduzierenden Luft-Azetylen-Flamme bestimmt. Zur Prüfung

der Richtigkeit der Bestimmung ist ein Wiederfindungsrate-Test durchgeführt worden. Die aliquoten Mengen der Plazenta-Stammlösungen wurden im Verhältnis (1+19) mit Verdünnungslösung verdünnt. Die chemischen Störungen sind durch Zugabe von 1 g La. l^{-1} beseitigt worden. Brennerhöhe und Brenngas-Oxidans-Verhältnis wurden auf maximale Extinktion eingestellt.
Reagenzien: Mg-Stammlösung = Titrisol (1 g Mg. l^{-1}).
Magnesiumlösungen= 2,5 bis 30,0 ppm Mg in Blindlösung.
Blindlösung = 0,2 % Trinatriumzitrat-2-hydrat in 3% iger H_2SO_4 wurde (1+19) mit Verdünnungslösung verdünnt.
Verdünnungslösung = 1g La. l^{-1} in 0,1 N HNO_3.
Blindwert : zu vernachlässigen.
Optimaler Arbeitsbereich : 0,125 - 1,00 ppm Mg (Standardkurve Abb. 17).

Den Magnesiumgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials gibt Tabelle 30 wieder. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und Frischmaterial sind in Tabelle 17 zusammengefaßt, und das Ergebnis des Wiederfindungsrate-Tests zeigt Tabelle 29.

Resultate und Diskussion

Der Magnesiumgehalt der menschlichen (sowie tierischen) Plazenta ist bis heute nur in wenigen Einzelfällen untersucht worden (21,24,223-226). Die Ursachen für die oft abweichenden Befunde dürften wohl methodische Fehler sein.

Mischel (223) bestimmte den Magnesiumgehalt von normalen, reifen, bluthaltigen menschlichen Plazenta mittels einer komplexometrischen Titrationsmethode und fand dabei eine Mg-Konzentration von 88,7 ppm in der Frischsubstanz. Becker (225) konnte keine signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den verschiedenen Plazentenarten (von Pferd,Schaf, Rind und Mensch) feststellen und erhielt mittels der Flammen-AAS für alle untersuchten Plazenten einen Durchschnittwert

von 87,4 ppm Mg im Frischgewicht. Dawson et. al. (21) haben ebenfalls mit Hilfe der Flammen-AAS in blutfreien gepreßten Humanplazenten einen Mg-Gehalt von 0,98 $\pm$ 0,34 μ Mol. g^{-1} im Trockengewicht ermittelt. Andererseits fanden Thieme u. Mitarb. (24) gleichfalls mittels der Flammen-AAS viel zu hohe Werte (3650 ppm in gefriergetrockneten Plazentakotyledonen !).

Wir haben hier auch mit Hilfe der Flammen-AAS in normalen bluthaltigen Humanplazenten aus dem Raum Berlin (West) einen Magnesiumgehalt von 596,3 $\pm$ 60,5 ppm im Trocken-bzw. 102,2 $\pm$ 10,4 ppm im Frischmaterial gefunden. Allerdings sind diese Ergebnisse für die gesamte Humanplazenta repräsentativ.

Die relativ hohe Konzentration des Magnesiums in Humanplazenten erlaubte eine angemessene Verdünnung der Analysenlösungen. Auf diese Weise wurde die Bestimmung des zu untersuchenden Elementes in einer schwach sauren Lösung durchgeführt, d. h. geradezu in idealer Form zur Bestimmung durch die Flammen-AAS. Weiterhin wurden eventuelle chemischen Störungen durch Zugabe von 1 g $La.l^{-1}$ ausgeschlossen.
Die Richtigkeit der Bestimmung ist mit Wiederfindungsraten zwischen 99,6 und 104,0 % geprüft worden. (Tabelle 29)

Tabelle 27 Geräteeinstellung für Flamme-AAS

Parameter	Mg-Bestimmung
Wellenlänge (nm)	285,2
Spalt (nm)	2,0
Lampe	HKL
Meßart	Messen, Ext.
Dämpfung	2
Schreiber	10 mV, 30 mm/min
Flamme (reduz.)	Luft-Azetylen
Brennerkopf	Standard
DUK	Aus

Tabelle 28 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der AAS-Bestimmung des Magnesiums nach dem Routineverfahren

Standardlösungen (ppm Mg)	Mittlere Extinktionen* (%)				Mittelwerte (%)
0,125	6,5	6,6	6,5	6,6	6,6
0,250	12,3	12,2	12,2	12,3	12,2
0,500	24,3	24,4	24,6	24,5	24,5
0,750	35,2	34,7	35,4	35,5	35,2
1,000	46,8	46,9	47,6	47,2	47,1
1,250	53,3	53,8	54,0	53,9	53,8

* Mittlere Extinktionen von je zwei Messungen

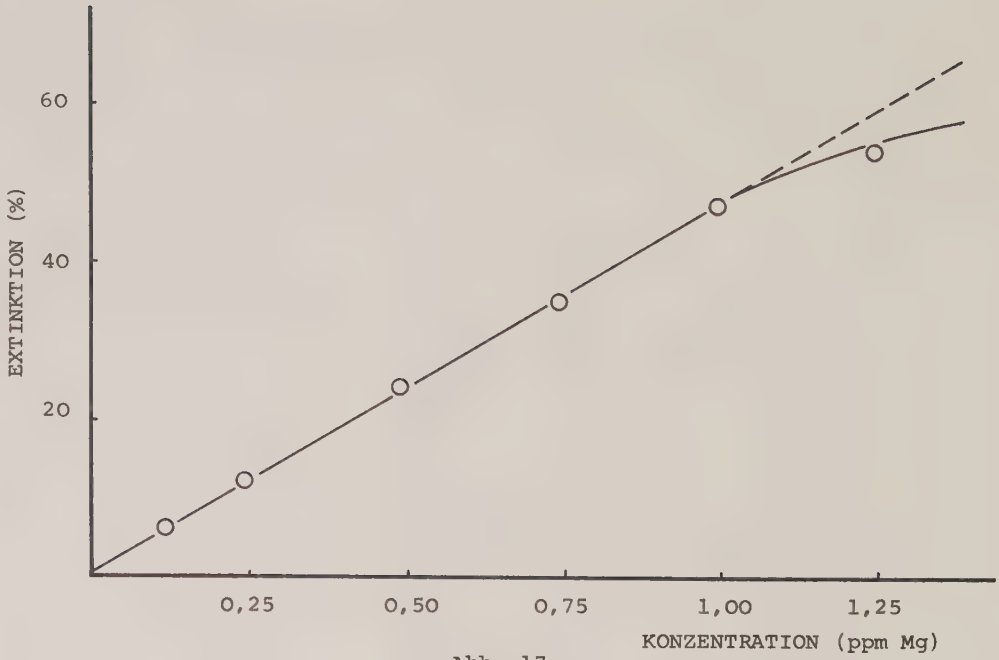

Abb. 17

Standardkurve für die AAS-Bestimmung des Magnesiumgehaltes nach dem Routineverfahren

Tabelle 29 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Lösungen	Zusatz (µg Mg/ml)	Gesamter Mg-Gehalt (ppm)	Wiederfindungsrate (%)
B	-	0,595	-
B (50%)	-	0,303	101,7
B (50%)	0,125	0,437	103,6
B (50%)	0,250	0,546	99,6
B (50%)	0,500	0,830	104,0

Tabelle 30 Magnesiumgehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwerte (%)	Plazenta-lösungen (ppm Mg)	Trockenmaterial (ppm Mg)	Frischmaterial (ppm Mg)
F	25,4	25,7	25,5	13,08	654,0	112,10
G	21,4	21,6	21,5	11,01	550,5	94,36
H	32,1	31,7	31,9	16,33	816,5	139,95
I	22,2	22,0	22,1	11,32	566,0	97,01
J	19,1	18,9	19,0	9,73	486,5	83,39
K	23,2	22,9	23,0	11,80	590,0	101,13
L	18,9	18,8	18,8	9,65	482,5	82,70
M	20,1	20,0	20,0	10,27	513,5	88,01
N	25,0	25,2	25,1	12,85	642,5	110,12
O	20,5	20,4	20,4	10,47	523,5	89,73
P	22,0	22,1	22,0	11,29	564,5	96,76
Q	23,5	23,4	23,4	12,01	600,5	102,93
R	22,8	22,7	22,8	11,65	582,5	99,84
S	23,7	23,8	23,8	12,16	608,0	104,21
T	21,9	21,6	21,8	11,14	557,0	95,47
U	21,1	21,5	21,3	10,91	545,5	93,50
V	28,6	28,5	28,6	14,62	731,0	125,29
X	24,4	24,5	24,4	12,52	626,0	107,30
Y	24,1	23,9	24,0	12,29	614,5	105,32
Z	26,1	26,3	26,2	13,41	670,5	114,92

*Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

6. Anwendung eines Trennung-Anreicherungs-Verfahrens für die Bestimmung von Schwerelementen durch die flammenlose Atom-Absorptions-Spektroskopie

Quecksilber und Blei zählen neben Cd, Tl, As und Se zu den chemischen Elementen, deren Giftigkeit und zunehmende anthropogene Anreicherung in der Biosphäre in jüngster Zeit Anlaß zu großer Besorgnis geben. Das wahre Ausmaß der drohenden Gefahren kann man jedoch nur beurteilen, wenn die Ursachen auch im Detail eindeutig bekannt sind. Bei der Aufklärung dieser häufig sehr komplexen Zusammenhänge geochemischer und biologischer Kreisläufe fällt analytischen Daten eine entscheidende Rolle zu (233). Leider war die analytische Chemie auf diese neue Aufgabe nur schlecht vorbereitet.

Neuerdings wird mit Recht argumentiert, man darf der kommerzialisierten Analytik keinesfalls trauen, zumindest nicht in dem Extremspurenbereich. Vielmehr mußte man erst noch leistungsfähigere Methoden ausarbeiten. In der Tat sind die Ergebnisse im ppm-Bereich heute in der Regel bereits recht zuverlässig, aber bei geringeren Gehalten (ppb-Bereich) nimmt die Streuung der relativen Abweichungen stark zu. Der Grund hierfür ist, daß sich den statistischen Fehlern im Bereich sehr niedriger Konzentrationen systematische Fehler überlagern. Besonders die Bestimmung von Spurenelementen wie Pb und Hg setzen sehr aufwendige Arbeitsweisen und langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Spurenanalyse voraus. Eine absolut gesicherte Analyse verlangt u.a. einen Vielfalt von Kontrollmaßnahmen und mehreren paralell entwickelten Verfahren.

Im Rahmen unserer Untersuchungen von Humanplazenten auf dem Gehalt an verschiedenen Spurenelementen entstand das Problem, die umweltrelevanten toxischen Metalle Pb und Hg in den sauren Aufschlußlösungen durch flammenlose AAS mit

der Graphitrohrküvette zu bestimmen. Die zu untersuchenden Plazenta-Stammlösungen enthalten relativ hohe Salzgehalte und hohe Konzentration an gelösten organischen Substanz (0,2 % Trinatrumzitrat-2-hydrat als Stabilisator) und Schwefelsäure, was starke unspezifische Absorption und komplexe Matrixeffekte bei der Analyse von leicht flüchtigen Elementen in der Graphitrohrküvette hervorruft. Während " Normalkonzentrationen " der bereits untersuchten Spurenelemente in Humanplazenten ohne vorherige Anreicherung bzw. Extraktion bestimmt werden kann, liegen die Konzentrationen von Pb und Hg in einem Bereich, in dem eine direkte Bestimmung dieser Metalle nicht mehr zuverlässig möglich war. Es wurde daher eine Abtrennung bzw. Anreicherung erforderlich.

6.1. Trennungs- und Anreicherungsverfahren für die zu untersuchenden Spurenelemente

Die Voraussetzungen für die Untersuchung einer Lösung durch die AAS sind, (a) daß die Konzentration der zu bestimmenden Elemente ausreichend hoch ist, (b) daß in der Analysenlösung keine Elemente oder Substanzen vorhanden sind, die zu den störenden Interferenzen mit den zu bestimmenden Elementen führen, und (c) daß die Analysenlösung keine Kationen und Anionen enthält, die die Empfindlichkeit der Methode beeinträchtigen. Sachgemäße Probenvorbereitung und Aufschluß vorausgesetzt, stellt sich also für den Spurenanalytiker fast stets das Problem, die im großen Überschuß vorliegenden Elemente bzw. Substanzen nicht Störfaktor bei der Erfassung der Spuren werden zu lassen.

Die Atom-Absorptions-Spektroskopie mit der Graphitrohrküvette ist zur direkten Bestimmung von mehreren Elementen in der Aufschlußlösung biologischer Materialien geeignet. Aber besonders bei der Bestimmung von Pb und Hg ist eine Trennung der Makrokomponente vor der Atomisierung vorzuziehen, da sonst starke Matrixeffekte und ungenügende Empfindlichkeit festzustellen sind.

Solventextraktionen zur Anreicherung bzw. Abtrennung von Spurenelementen von verschiedenen Materialien stehen in großer Anzahl zur Verfügung. Leider werden bei den meisten Extraktionsmethoden wichtige Grundlagen nicht berücksichtigt; die Extraktionstechniken müssen hinsichtlich pH-Bereich, Puffer, Ionenstärke,Stabilität, Gleichgewichtszeit usw. optimiert werden (234). Bei den meisten Methoden wird die Matrixmasse verworfen und die Selektivität ist im allgemeinen für die Spurenelemente unzureichend (235).

Organische Komplexbildner sind mit Erfolg zur Anreicherung von Spurenelementen und Beseitigung von Matrix-Effekten in der AAS angewendet worden. Dennoch sind Extrak-

tions- oder Mitfällungsstufen erforderlich, um die Komplexe aus der wäßrige Phase zu gewinnen. Bei der Extraktionstechnik entstehen große Extraktenvolumina, die einer zeitraubenden Verdampfung a posteriori bedürfen. Bei der Mitfällungstechnik benutzt man einen Träger, der zusätzliche Matrixeffekte mit sich bringen kann. Ferner ist eine Vielfalt von Ionenaustausch-Verfahren in der Literatur zu finden, die mehr oder weniger geeignet für die Anreicherung von Spurenelementen sind.

Um ein Metall mit organischem Lösungsmittel extrahieren zu können, muß dieses zunächst aus derionogenen in eine ungeladene Form überführt werden. Das geschieht in der Regel durch Komplexbildung mit einem organischen Liganden. Die Kombination von Carbamaten als Chelatbildner und Methylisobutylketone (MIBK) als organisches Lösungsmittel, die besonders bei der AAS eine größere Verbreitung gefunden hat, ist dem Spurenanalytiker schon lange bekannt (u.a. 100,119,168,174,212,218,234-43).

Nach Hellmann (238) und anderen fallen in annähernd neutralem Medium mit Natriumdiäthyldithiocarbamat (Na-DDTC) praktisch alle relevanten Schwermetalle. Deshalb haben wir auch die hier beschriebene Anreicherungsmethode mit geringen Modifikationen zur Bestimmung weiterer Spurenelemente mittels der NAA angewendet, da der Komplexbildner (Carbamat) unter denselben Bedingungen mit mehreren Elementen (ca. 35) gleichzeitig reagiert.

Eine chemische Abtrennung bzw. Anreicherung der Spurenelemente in einer Säulen durch die "Reverse-Phase-Technik" (236) stellt sich in diesem Zusammenhang als eine hervorragende Möglichkeit für Verbesserung der Empfindlichkeit und für Beseitigung verschiedener Störfaktoren zugleich dar. Bei dieser Methode handelt es sich um eine reversible Absorption von metallorganischen Komplexen an der Oberfläche feiner Partikeln. Die gesamte Leistung des Verfahrens entspricht wiederholter konvenzioneller Extraktion. Die Komplexbildner können sowohl zu der organischen als zu der wäßrigen Phase zugesetzt werden.

Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sind hohe Verteilungs-

koeffizienten gewünscht, um gute Trennungen mit wenigen Extraktionsstufen zu bekommen. Bei der "Umkehrphase-Technik" können wiederholter Extraktionen-Effekt und quantitative Ausbeutung erwartet werden, selbst bei niedrigen Verteilungskoeffizienten. Die wichtigen Merkmale der Extraktionsagenten in Umkehrphase-Verfahren schließen niedrige Wasserlöslichkeit der organischen Phase und starke adsorptive Kräfte zwischen der organischen Phase und der Trägeroberfläche ein. Da die Diffusion der Komplexe in die organische Phase relativ schnell ist, sind hohe Elutionsraten möglich (236). Als Elutionsmittel lassen sich grundsätzlich alle Lösungsmittel verwenden, die bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion eingesetzt werden. Besser geeignet sind aber Benzol, Chlorbenzol, 1,2-Dichlorbenzol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Tetrachloräthylen, Trichloräthylen, Methylisobutylketone, usw. Sehr leichtflüchtige Lösungsmittel sind weniger geeignet, da bei diesen leicht Verluste auftreten können, die ein quantitatives Arbeiten erschweren. Deswegen wurde MIBK als Elutionsmittel gewählt.

Unter Adsorption versteht man im allgemeinen eine Anreicherung von Molekülen oder Atomen einer oder mehrerer Molekülsorten aus einer flüssigen oder gasförmigen Phase an der Oberfläche eines Festkörpers oder auch einer Flüssigkeit (244). Die Absorption von Carbamaten(die meist angewendeten Trennungsmethoden von Schwermetallen beruhen auf Carbamatkomplexen!) an sylierter Oberfläche des Kieselgurs wurde in früheren Arbeiten untersucht. Es ist bewiesen, daß Carbamate direkt an Aktivkohle oder an sylierter Oberfläche stark absorbiert werden und daß die Adsorptionsfähigkeit solcher Oberflächen höher als die eines flüssigen Extraktands sind. Das Adsorbat (die an der Säule hängenden Carbamate der Schwermetalle) kann nach der Verdrängung des überschüssigen Wassers aus der Säule mit Hilfe von organischen Lösemitteln leicht eluiert und in eine angemessene Form für die Bestimmung übertragen werden.

Arbeitsvorschrift

Wir haben die Technik von Knapp u. Mitarb. (237) als Grundlage für unsere Arbeit benutzt.

Aufstellung der Säulen: Zuerst wurden die Glassäulen (8mm Ø, 35 mm lang) angemessen mit Glaswolle und einem Membranfilter am unteren Ende abgeschlossen. Dann wurden sie mit dem Trägermaterial bis auf eine Höhe von 2o- 25 mm gefüllt und das obere Ende mit einem Membranfilter und Glaswolle bedeckt. Silikonstopfen und Silikonschläuche wurden benutzt. Vor der Inbetriebsetzung wurde Äthanol abs. durch die Säulen passiert und danach mit demineralisiertem destilliertem Wasser gespült. Nach dieser Vorbehandlung und etwa 10 Min. Betrieb in trockener Luft waren die Säulen funktionsfähig.
Vorbereitung der Probenlösungen: Aliquote Mengen von 100 ml der Plazenta-Stammlösungen wurden mit 20 ml Pufferlösung pH 5,O zugemischt. Nach Einstellung zu genau pH 5,O mittels der Natriumhydroxidlösung wurde 10 ml Reagenzlösung zugegeben.
Inbetriebsetzung: Mittels einer zweigängigen peristaltischen Pumpe wurden gleichzeitig zwei Säulen bedient. Die vorbereiteten Probelösungen wurden durch Silikonschläuche sorgfältig abgesaugt. Nach der ersten Elution wurden 5 ml Reagenzlösung dem Eluat zugegeben und das ganze wiederum durch die Säule abgesaugt. Das zweite Eluat war in der Regel völlig durchsichtig und niederschlagsfrei. Bei der Zumischung neuer aliquoter Mengen der Rea_genzlösung wurde keine weitere Reaktion bemerkt. Die Säulen wurden wie vorher durch 10 Min. Betrieb im trocken Luftstrom getrocknet. Eventuelle übriggebliebene Wassertropfen waren während der Elution der Säulen mit MIBK in der ersten Eluatfraktion ausgeschwemmt worden.
Elution des Adsorbats: Die Carbamate des Schwermetalls, die an der Säule adsorbiert waren, wurden mit aliquoten Mengen von je O,5 ml MIBK (bei einem optimalen Volumenstrom der peristaltischen Pumpe von O,2 ml. s^{-1}) allmählich eluiert und das organische Eluat in 20 ml- Polyäthylenflaschen aufgenommen. Mit ca.

5 - 8 ml Lösungsmittel war das Adsorbat vollständig aus der Säule eluiert. Nach Zugabe von 2- 3.Tropfen einer Na.DDTC-Lösung in Aceton zum organischen Eluat (ein Überschuß an Komplexbildner gewährleistet eine bessere Haltbarkeit des Carbamatkomplexes) wurde es mit MIBK auf 10 ml eingestellt. Um die Carbamate der Schwermetalle vor einem Zerfall zu schützen, wurden die Eluatlösungen im Kühlschrank bis zur FAAS-Bestimmung aufbewahrt.

Materialien und Reagenzien:

Meßkolben, Becher und Probenflaschen aus Polyäthylen wurden vor ihrer Benutzung gründlich mit verd. HNO_3gereinigt, um Metallspuren zu beseitigen. Die Becher wurden ständig mittels Parafilm M bedeckt, um die Lösungen vor Luftstaub zu bewahren. Alle angewendeten Reagenzien waren vom analytischen Grad oder Suprapur.

Lösungen: 1. Reagenzlösung: 0,2 %ige Na.DDTC
2. Pufferlösung HAc / Acetat pH 5,0
3. 50 % ige Natriumhydroxidlösung
4. MIBK zur Extraktionsanalyse.

Materialien: 1. Trägermaterial: Chromosorb W-DMCS 80-100 mesh
2. Silikonstopfen und Silikonschläuche
3. Tri-pour-Becher (Brand)
4. Parafilm M

Apparaten: 1. Euster München peristaltische Pumpe
2. Theodor Karow Präzisions-pH-Meter

Bemerkungen:

Das Ziel der nun beschriebenen Abtrennung-Anreicherungs-Methode war, möglichst in einem Arbeitsgang rasch die gesuchten Schwermetalle anzureichern und sie gleichzeitig von störenden Begleitstoffen zu trennen. Mittels dieser Methode haben wir eine befriedigende Vorbehandlung der Analysenlösungen erreicht, da (a) die zu bestimmenden Elementen gemäß der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode angereichert, (b) die zu bestimmenden

Elementen von der störenden Matrix angemessenen abgetrennt wurden und (c) die Methode keine Störsubstanzen bzw. keine große Kontaminationsgefahr mit sich bringt.

Diese Technik erlaubt eine rasche, einfache Anreicherung zahlreicher Spurenelemente (als Carbamate) an der Oberfläche von syliertem Kieselgur (Chromosorb W-DMCS) und eine ebenso rasche Elution mit kleinen Lösungsmittelvolumina (Anreicherungen von 2 Größenordnungen können erreicht werden). Die Vorteile im Vergleich mit konventionellen Extraktionen und Mitfällungen sind Abwesenheit von Trägern,kleine Elutionsvolumina, Einsparung von Lösemitteln, u.U. Einsparung von Arbeitszeit, keine Emulsionsbildung, hohe Wiederfindungsraten und gute Reproduzierbarkeit. Außerdem lassen sich die Säulen beliebig oft benutzen. Die Wiederfindungsrate einer einzigen Elution nach Knapp u. Mitarb. (236) sind in Tabelle 31 zu ersehen. Die gesamte Anordnung ist in Abb. 18 zu betrachten.

In der Nähe vom pH 5,0 wurde hier quantitative Adsorption für Zn, Cu, Ni, Pb, Hg, Cd und Co erzielt. Mit einer zweimaligen Elution durch die Säule ist eine 100 % ige Adsorption zu erzielen.

Die Zersetzungsgeschwindigkeit des Carbamatenkomplexes hängt auch stark vom pH ab. Ist man hier gezwungen, unterhalb pH 6,0 zu arbeiten, muß die Arbeit rasch und mit einem der Zersetzung entsprechenden Reagenzüberschuß durchgeführt werden. Trotz dieser Schwierigkeit haben wir keine signifikanten Abweichungen gefunden, als die Analysenlösungen zwei Wochen im Kühlschrank (im Dunkel) aufbewahrt waren.

Tabelle 31 Wiederfindungsraten von Zn, Cu, Ni, Pb, Hg, Co, Cd und Fe bei verschiedenen pH-Werten mit der Trennung-Anreicherungsmethode (236)

Elemente	Wiederfindungsrate (%)			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
Zn,Cu,Ni,Pb,Hg,Co	98-100	98-100	98-100	98-100
Cd	98-100	98-100	75-100	65-100
Fe	98-100	98-100	98-100	32-36

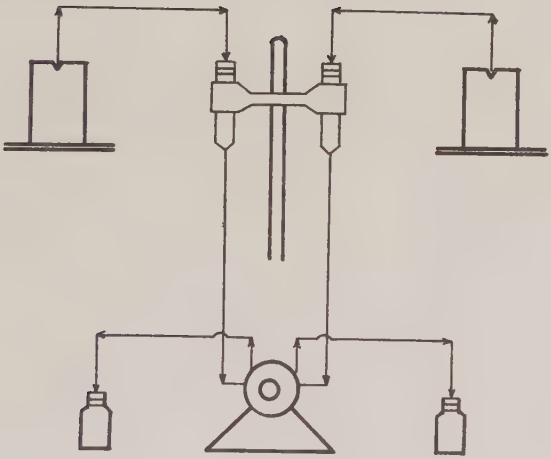

Abb. 18

Anordnung für das Trennung-Anreicherungs-Verfahren

6.2. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Bleigehaltes

Mit der wachsenden Industrialisierung und ansteigenden Bevölkerungszahlen in den Ballungsgebieten ist eine zunehmende Verunreinigung der Luft mit zahlreichen Fremdbestandteilen zu beobachten. Diese Imissionen wirken als Stoffgemisch auf den Mensch und seine Umwelt ein und führen zu Gefahren, erheblichen Nachteilen oder erheblichen Belästigung.

Besondere Bedeutung haben in unserer Zeit die toxischen Spurenelemente Blei, Quecksilber und Cadmium erlangt. Sie rechnen zu dem Sammelbegriff "Umweltchemikalien", Stoffe die durch menschliches Zutun in die Umwelt gebracht werden und in Mengen auftreten können, die geeignet sind, Lebewesen, insbesondere den Menschen zu gefährden. In den meisten Ländern ist man deshalb bemüht, die Kontamination der Umwelt an solchen Stoffen, in vertretbaren Grenzen zu halten.

Metallisches Blei und viele seiner chemischen Verbindungen sind der Menschheit schon seit vorgeschichtlicher Zeit bekannt. Obwohl die Erscheinungen der Bleivergiftung zu damaliger Zeit sicherlich bekannt waren, ist der Zusammenhang mit dem Umgang sowie der Verwendung des Metalls und seiner Verbindungen nicht durchschaut worden. Neben seiner wichtigen Rolle als gewerbliches Gift erlangt das Blei in moderner Zeit als Folge der zunehmenden Industrialisierung und Motorisierung eine immer größere Bedeutung als Umweltgift (3,4,190,245-252).

Auf Grund der weltweiten Kontamination des Wassers, der Böden und der Atmosphäre mit Blei ist es sehr schwierig, zwischen natürlichen (z.B. Erosion bleihaltiger Lagerstätten) und anthropogenen Bleianreicherungen zu unterscheiden. Im Laufe der Zeit fand eine Verschiebung der durch den Menschen bedingten Bleipollution statt : Der erste Aufstieg der Bleikonzentration in der Umwelt ist auf Schmelzprozesse und Kohlenverbrennung zu Beginn des industriellen Zeitalters zurückzuführen. Mit der

Einführung bleihaltiger Zusätze als Antiklopfmittel für Treibstoffe in den 20 iger Jahren dieses Jahrhunderts wurde jedoch eine neue und weit ergiebigere, die Biosphäre belastende Bleiquelle geschaffen (246). Nach aktuellen Untersuchungen lassen sich je nach Verkehrsbelastung, Industrienähe und Witterungsverhältnissen des Standortes teilweise sehr unterschiedliche Bleikonzentrationen nachweisen; aber etwa 98% des in der Biosphäre vorhandenen Bleis stammt aus Benzin.

Das unmittelbar mit den Autoabgasen emittierte Blei liegt vorwiegend in Form von Halogeniden vor. Von diesem Blei treten in der Atmosphäre 10 bis 20% gasförmig auf, der Rest ist fester Bestandteil von Aerosolen, in denen Blei mit einer Partikelgröße zwischen 0,5 und 2 μm vorliegt. Aus Studien mit Pb-210 geht hervor, daß Blei in Form von Aerosolen bis zu 30 Tagen in der Atmosphäre verbleiben kann. Diese Verweildauer genügt, um Bleiverbindungen weltweit zu verbreiten. Auf Grund der Verteilungsform als Aerosol wird Blei von der Pflanze teilweise über ihren Gasstoffwechsel aufgenommen und angereichert. Allgemein weisen pflanzliche Gewebe in der Nähe bleiverarbeitender Betriebe und im näheren Bereich stark befahrener Straßen besonders hohe Bleikonzentrationen auf.

Blei in der Atmosphäre wird durch Aggression bleihaltiger Partikel und durch Niederschläge dem Boden zugeführt. Während das unmittelbar nach der Emission analysierte Blei zum überwiegenden Teil in Form von Halogeniden vorliegt, treten in 18 Std. alten Abgasen an Stelle der Halogenidverbindungen (durch Einwirkung des atmosphärischen Wassers und Kohlendioxids) vermehrt Bleicarbonate und Bleioxide auf. Es handelt sich hierbei nicht um photolytische Umwandlungen der Bleiverbindungen,da der Austausch der Halogene auch im Dunkeln erfolgt. Da die Bleihalogene sehr viel giftiger als die Carbonate und Oxide, ist dieser Befund für die Beurteilung der Bleitoxität für verkehrsnahe Wohngebiete sicherlich von Bedeutung. Aber der Bleibefall aus der atmosphärischen Luft in Form des Straßenstaubes ergab in einigen deutschen Industriestädten Werte zwischen 0,16 und 4,8 mg. m^{-2}. Tag $^{-1}$ (245). Eine nicht zu

vernachlässigende Emissionsquelle für Blei und Bleiverbindungen dürften auch die Müllverbrennungsanlagen darstellen. Bei den Schmelztemperaturen (über 800 °C) kann davon ausgegangen werden,daß der größte Teil des zugeführten Bleischrottes verdampft.

Vergiftungen durch Einatmen von bleihaltigen Staub stellen auch heute noch eine der häufigsten Berufserkrankungen dar. Besonders gefährdet sind dabei Arbeiter in Akkumulatoren-,Bleifarbenfabriken und Bleihütten. Der vielseitige Gebrauch von Blei und seine Verbindungen bringt trotz zahlreicher Sicherheitsbestimmungen immer noch die Möglichkeit nicht beruflicher Vergiftungen mit sich, deren Gefährlichkeit vor allem darin liegt, daß sie oftmals erst spät oder überhaupt nicht als Intoxikationen erkannt werden. So stellt sich die Verwendung des Bleis für die Herstellung von Trinkwasserleitungen, wie sie auch heute noch in alten Wohnhäusern anzutreffen sind, eine potentielle Vergiftungsquelle dar (245). Eine weitere Gefahr stellt sich der Gebrauch von Gefäßen mit bleihaltigen Glasuren zur Aufbewahrung oder Zubereitung von Lebensmitteln dar, da besonders sauer reagierende Flüssigkeiten beträchtliche Mengen Blei zu lösen im Stande sind (251). Durch Verschlucken bleihaltiger Wandfarben und Schrotkugeln haben sich schwere Vergiftungen bei Kindern ereignet (253). Verschiedene Autoren schlagen die Untersuchung von Milchzähnen auf das Bleigehalt zur Kontrolle chronischer Exposition und Akkumulation vor (253, 254). Die verkehrs- und industriebedingten Unterschiede der Luftbleigehalte widerspiegeln sich auch in den meist signifikant höheren mittleren Blutbleigehalten der Großstadtbevölkerung im Vergleich zu Bewohnern ländlicher Gebiete (252). Neben den aus früherer Zeit bekannten Blei-Exposition durch Wasserleitungen, Nahrungsbehälter, Farben, Topferglasuren und Insetiziden kommen in den letzten Jahrzehnten diejenige durch Zigarrettenkonsum und Kosmetika hinzu(22).

Die Methylierung des Quecksilbers und Arsens ist gut dokumentiert, aber sehr wenig ist über die Existenz von organischen Bleiverbindungen in der Umwelt als Ergebnis einer Biomethylierung bekannt. Verschiedene Experimente haben gezeigt, daß eine Konversion von anorganischem Blei in $Pb(Me)_4$ möglich ist, wobei der Prozeß ausschließlich von biologischen

Charakter ist (256,257). Verschiedene biogeochemischen Zyklen für mehrere Schwermetalle werden z.Zt. vorgeschlagen.

Die Aufnahme von Blei kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen: über den Magen-Darm-Trakt, duch die Lunge und durch die Haut. Oral aufgenommenes Blei wird von der gesunden Schleimhaut des Magen-Darmkanals nur zu einem relativ geringen Anteil (5-10%) resorbiert. Die Aufnahme durch die Lunge in Form von bleihaltigen Staub stellt die häufigste Ursache von Bleivergiftungen dar. Im Gegensatz zu oral aufgenommenem Blei wird es hier zu einem wesentlich größeren Prozentsatz (40-50%) resorbiert, und deswegen wirken gleiche Bleimengen bei Einatmung weit toxischer als bei oraler Zufuhr. Nur für organische Bleiverbindungen kommt in der Praxis die Möglichkeit einer Hautresorption.

Die Bleiaufnahme durch den Menschen erfolgt in Städten zu etwa gleichen Teilen aus Luft und Nahrung, in Gebieten geringer Luftverunreinigung mehr aus der Nahrung. Gegenüber der aus der Nahrung und Luft resorbierten Menge ist die Aufnahme aus dem Wasser gering und beträgt weniger als 10%(258). In einem hoch belasteten Gebiet ist aber die Bleiaufnahme per Inhalationen so groß, daß die zusätzliche orale Zufuhr im Blutbleispiegel nicht mehr zum Tragen kommt (248).

In der Bundesrepublik beträgt die tägliche Bleizufuhr mit der Nahrung etwa 500 µg. Dazu kommt das mit der Atemluft angenommene Blei (im Durchschnitt 40 µg pro Tag). Das resorbierte Blei gelangt zunächst in den Blutkreislauf. Mehr als 90% werden dabei an die Erythrozyten gebunden, der Rest liegt im Plasma als Pb^{2+}- Ionen vor. Der durchschnittliche Blutbleigehalt bewegt sich zwischen 10 und 40 µg/100ml Blut. Blutbleigehalte von mehr als 0,8 ppm sind als sicheres Zeichen einer Intoxikation zu werten.

Der Bleibestand des "normalen Menschen" wird auf etwa 135 mg geschätzt, aber 90 % von ihm entfallen auf das Skelett. Im Gegensatz zur anorganischen Bleiverbindungen wird Bleitetraäthyl in Form des Triäthylbleiions bevorzugt in fettreichem Gewebe (Leber, Niere, Gehirn) gespeichert. Die Ausscheidung,

besonders des oral zugeführten Bleis erfolgt überwiegend durch die Faeces, in geringerem Umfang durch den Urin. Die normale Bleikonzentration im Urin reicht bis 80 ppb; Konzentrationen über 150 ppb sind bedenklich. Im menschlichen Haar befindet sich ein durchschnittlicher Gehalt von etwa 20ppm Pb; bei Fällen von chronischer Bleivergiftung wurden stark erhöhte Werte bis 975 ppm Pb festgestellt. Der Bleigehalt der Haare kann deshalb Hinweise auf das Ausmaß einer entsprechend dem Wachstum des Haares zurückliegenden Bleibelastung.

Obschon kein anderes Metall so intensiv auf seine Wirkungen überprüft wurde, gehen diesbezügliche Auffassungen heute noch immer auseinander. Außerdem ist die Toxikologie des Bleis außerordentlich komplex, da es nahezu alle Stoffwechselprozesse eingreifen vermag. Belastungen, Beeinträchtigungen und Schäden durch Blei und seine Verbindungen stehen gegenwärtig in zwei Bereichen zur Diskussion. In der Arbeitswelt rangieren Erkrankungen nach wie vor an der Spitze der chemisch bedingten Berufskrankheiten . In der Umwelt hat die Diskussion über die gesundheitlichen Auswirkungen der Luftverschmutzung durch Blei ebenfalls erhebliche Bedeutung erlangt.

Als wesentliche Erklärung für Hemmungen von Enzymen durch das Blei ist die Oxidation der SH-Gruppen herangezogen worden. So bildet Blei wie Quecksilber und Cadmium Mercaptide mit der SH-Gruppe von Cystein und weniger stabile Komplexe mit Seitenketten anderer Aminosäuren. Proteine mit vielen freien SH-Gruppen wie Thionein binden Blei sowohl in vivo als auch in vitro.

Der Organismus besitzt ein hohes Kompensationsvermögen gegenüber Schwermetallen , so daß es erst nach Erschöpfung der biologischen Systeme zur völligen Inaktivierung der Enzyme kommt. Erst bei einem Blut-Bleispiegel von 1ppm fällt beim Menschen der Hb-Spiegel leicht ab. Diese Aussage wird allerdings von vielen Autoren bestritten.

Enzyme, die nicht in die Hämatopoese eingreifen, werden ebenfalls durch Blei beeinflußt. Das geschieht auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen: Einmal kann durch die Bleiabsorption ein Gewebeschaden auftreten, wodurch Gewebeenzyme

ins Blut abgegeben werden, zum anderen können inhibitorische Effekte auf Enzymen vorkommen.

Aus der Fülle der bislang bekanntgewordenen oder vermuteten schädlichen Wirkungen auf den Stoffwechsel des Menschen (z.B. Anämie, Ermüdungserscheinungen, Gewichtsverlust, chronische Nierenleiden, neurologische Veränderungen) seien in diesem Zusammenhang nur drei hervorgehoben: Wirkung des Bleis auf die Häminsynthese, auf das Nervensystem und auf die Chromosomen.

Das klassische Symtom einer Bleivergiftung ist das Auftreten von nicht an Häm gebundenen Eisen und Protoporphyrin 9 in Erythrozyten, die Anhäufung von δ- Aminolävulinsäure im Serum und eine erhöhte Ausscheidung von δ-Aminolävulinsäure und Coproporphyrinogen 3 mit dem Urin (246). Das Blei greift hierbei spezifisch in den Metabolismus der δ-Aminolävulinsäure und die Bildung von Häm aus Eisen und Protoporphyrin ein. Beide Schritte werden von Enzymen katalysiert, deren Aktivität vom Vorhandensein freier Sulfhydrylgruppen abhängt. Das Blei maskiert diese Gruppen, die Folge ist eine Inaktivierung der entsprechenden Enzyme. Bei Anwesenheit toxischer Bleimengen kommt es sodann zum Rückstand der umsetzenden Substrate, die sich im Serum bzw.Urin frühzeitig nachweisen lassen.

Die Wirkungen von Blei auf das Nervensystem sind vielseitig. Sie hängen ab von Dauer und Intensität der Einwirkung, sowie von der Art der Bleiverbindung. Vor allem das kindliche Gehirn ist empfindlich gegen eine erhöhte Bleiaufnahme; die meisten durch Blei verursachten Hirnschäden treten in jugendlichem Alter auf. Untersuchungen an bleibelasteten Kindern weisen nach, daß der altersabhängige Intelligenzq_uotient (IQ) im Vergleich zu einer Kontrollgruppe deutlich niedrig war.

Eine vieldiskutierte Frage ist die nach der möglichen Wirkung des Bleis auf das Erbgut . Versuche zeigten, das 1% iges Bleiazetat als Futterbeigabe bei Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung der Chromosomenaberrationen führt. Die bisher vorliegenden Chromosomenuntersuchungen an besonders bleibelasteten Berufsgruppen (Bleiarbeiter) erbrachten keinen Zusammenhang zwischen Blei und sichtbaren Veränderungen des Erbgutes.

Aus diesen Gegebenheiten wird geschlossen, daß Blei entweder einen sehr geringen oder möglicherweise garkeinen Einfluß auf das Erbgut des Menschen hat. Auf der anderen Seite wird berichtet, daß bei chronisch bleivergifteten Kindern eine Erhöhung von Chromosomenbrüchen vorliegt. Es wurde allerdings auch bei beruflich exponierten Personen eine hohe Anzahl von Aberrazionen in Chromatiden und Chromosomen festgestellt (259) . Eine endgültige Aussage über das Ausmaß einer möglichen genetischen Schädigung durch Blei kann heute noch nicht gemacht werden. Es muß jedoch prinzipiell mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß steigende Menge an Blei in der Biosphäre schon heute Auswirkung auf künftige Generationen hat.

Weitere negative Einwirkungen des Bleis sind besonders auf die Nieren, Blutgefäße, Lunge und Herz zu erwähnen. Kinetik,Metabolismus und Toxizität des Bleis werden ferner stark durch andere Elemente beeinflußt. Antagonistische Effekte in biologischen Systemen wurden für Blei durch Mn und Mo,Zn, As und Cu, Fe und Iod beschrieben. Anscheinend hat Chrom einen protektiven Effekt in Ratten, die niedrige Bleimengen über längere Zeit aufnahmen (247).

Die Akkumulation von Blei beginnt im Fetus und die Verteilung von Blei im fetalen Gewebe entspricht bereits der des erwachsenen Menschen. Die Plazentapassage wurde in zahlreichen Tierversuchen nachgewiesen und auch für den Menschen bestätigt. Mit steigendem Alter baut sich ein Körperpool von ca. 135 mg Pb auf und nach der zweiten Lebensdekade ist dann bei gleichbleibender Exposition keine altersabhängige Veränderungen des Bleigehaltes der meisten Weichgewebe, des Blutes und des Blutserums mehr zu beobachten. Ob das inaktive Bleidepot in den Knochen eine Gefahr darstellt, ist bis heute nicht geklärt. Es gibt Hinweise darauf, daß bestimmte Erkrankungen oder Streßzustände zur Mobilisation von Depotblei führen können.

Als eine weitere Risikogruppe gelten schwangere Frauen, da eine diaplazentare Übertragung des Bleis auf dem Fetus als gesichert gilt (248). Aufgrund tierexperimenteller Befunde wird eine besondere Empfindlichkeit von Schwangeren gegen Blei

in Hinsicht auf die Entwicklung des Fetus in der Literatur diskutiert. Zur Klärung, in welchem Maße während der Schwangerschaft Blei von der Mutter auf den Fetus wird, und ob die veränderte Stoffwechselsituation während der Gravidität zu einer Mobilisation von Blei aus dem mütterlichen Knochensystem führen kann, wurden in den letzten Jahren epidemiologische Untersuchungen an Schwangeren und deren Neugeborenen aus unterschiedlich belasteten Gebieten durchgeführt. Eine starke Beziehung zwischen der mütterlichen Bleibelastung und dem Blutbleispiegel der Neugeborenen wurde festgestellt. Die Blutbleispiegel der Neugeborenen lagen allerdings unter denen der Mutter.

Möglicherweise ist die Bleizufuhr durch Atemluft und Nahrung für den Säugling wesentlich geringer als die diaplazentare Zufuhr für den Fetus. Eine Aufschlüsselung der Untersuchungskollektive nach ökologischen Gesichtspunkten zeigt, das sich die Blutbleiwerte von Schwangeren und Neugeborenen aus ländlichen Regionen signifikant von denen aus städtischen Gebieten unterscheiden. Die ermittelte Differenz dürfte vorwiegend auf die unterschiedliche inhalative Belastung zurückzuführen sein, da die Nahrungsmittelversorgung in beiden Gebieten weitgehend identisch ist. Das deutet nochmals darauf hin, daß die Kraftfahrzeug-Verbreitung für die Mehrbelastung der Stadtbevölkerung eine wesentliche Rolle spielt.

Eine katastermäßige Erfassung der Bleibelastung von Müttern und Neugeborenen in Abhängigkeit vom Wohnort wurde von Hower u. Mitarb. (250) im Raum Essen begonnen. Zur Abschätzung der vorgeburtlichen Exposition untersuchte Engelhardt u. Mitarb. (261) Plazenten, die wegen der zumeist konstanten Expositionszeit als besonders geeignete Parameter zur Abschätzung einer Bleibelastung über einen bestimmten Zeitraum angesehen werden können. Der ermittelte Bleigehalt schwankte zwischen 49,6 und 453 µg/ Plazenta ($\bar{x}$= 145,7 µg). Eine Abhängigkeit von Belastungsgrad oder vom Blutbleispiegel konnte nicht nachgewiesen werden.

Einbrodt et al. (262) untersuchten die Verkalkungen von 33 menschlichen Plazenten aus einer mittleren Großstadt auf ihren Bleigehalt und ermittelte wesentliche hohe Gehalte von 9,58 - 4.536,4 µg Pb/Plazenta ($\bar{x}$ = 265,7 µg Pb).

Zur Festlegung der möglichen Zeitabhängigkeit der Bleianreicherung in den Plazenten untersuchte Engelhardt u. Mitarb. außerdem Plazenten von Frauen mit Frühgeburten und Aborten gesondert und setzte die Ergebnisse in Beziehung zur Schwangerschaftsdauer. Es ergab sich keine statistisch signifikante Korrelation.

Offen bleibt jedoch die Frage nach der innerorganismischen Herkunft des Bleis in Plazenta und Fetus, wenn der Blutbleispiegel der Mutter konstant bleibt oder sich sogar leichter erhöht. Auf eine Mobilisation von Speicherblei weisen die Ergebnisse von Haas u. Mitarb. (263) hin, der bei 35% der untersuchten Neugeborenen einen höheren Blutbleispiegel fand als bei der Mutter. Es müßte jedoch noch überprüft werden, ob dieses Ergebnis auch für nach dem Hämatokrit korrigierte Werte zutrifft.

Dawson u. Mitarb. (21) haben durch Flammen-AAS zu hohe Werte für die Bleikonzentration menschlicher Plazenten gefunden ($\bar{x}$ = 1,95 ± 1,42 μMol.g^{-1}). Ferner meint der Autor, daß ein Zusammenhang zwischen den niedrigen Bleigehalt und den toxemischen Zustand menschlicher Plazenten besteht. Vor kurzem haben Thieme u. Mitarb. (22) mittels FAAS wesentlich niedrigeren Bleigehalt in Plazenten aus den Räumen Altötting, München und dem Bayerischen Wald (0,1 -0,62 ppm Pb in gefriergetrockneten Plazentakotyledonen) erzielt. Die für das Element Blei extrem hohen Kontaminationsgrad menschlicher Plazenten im Bayerischen Wald konnte nicht erklärt werden. Ferner vermutet der Autor, daß in Anbetracht der hoch stoffwechselaktiven Plazenta eine Störung von Enzymsystemen durch die Schwermetalleinlagerung möglich ist.

Die Bestimmung kleiner Bleimenge in biologischem Material und Exkreten, insbesondere im Blut und Urin, spielt bei der klinischen Diagnose und Therapie von Blutvergiftungen eine wichtige Rolle. Die Bleibestimmung in Geweben und Knochen hat in der Gerichtsanalytik große Bedeutung.

Die meist angewendeten Methoden zur Bleibestimmung in biologischen und Umweltmaterialien, Pflanzen und Nahrungsmitteln sind die Spektralphotometrie (41,44,84,198,264-265), die Polarographie (170,179,266), die Röntgenfluoreszenzanalyse, (238,267,268) und, insbesondere, die Atom-Absorptions-Spektroskopie (21-22,101,103,110,119,131,137,157,166-168,170-172,174,176,218,

240-241,269-289). Eine Zeit lang wurde die Analyse von Bleispuren fast ausschließlich spektralphotometrisch mit Dithizon oder durch Polarographie durchgeführt. Die Röntgenfluoreszenzanalyse wurde wegen des großen Aufwandes wenig eingesetzt. Heutzutage wird die AAS angewendet.

Die spektralphotometrische Dithizonmethode (44,84,198,264-265) hat den Vorteil, daß sie praktisch in jedem Laboratorium ausführbar ist. Die Nachteile sind der große Zeitaufwand und das Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Lösemitteln. Die polarographische Methoden sind ziemlich störanfällig und umständlich. Katalytische Analysenmethode (200) wurden selten eingesetzt, da sie normalerweise auch zu umständlich sind.

Blei zählt zu den gegenwärtig am meisten untersuchten Elementen in biologischen Materialien. Die Bleibestimmung wird derzeit entweder mit der Flammen- (21,110,119,131,137, 168,171-172,174,240-241,271,286,289) oder mit der flammenlosen AAS (22,157,166-167,170,176,218,269-270,272-276,278-279,283, 287-288) durchgeführt.

Die Bestimmung von Blei läßt sich in den verschiedensten Flammen durchführen, ohne daß chemische Interferenzen zu erwarten wären. Meist wird eine Luft-Azetylen-Flamme verwendet, doch bevorzugen einige Autoren auch eine Luft-Propan-Flamme. Verschiedene Verfahren wurden für die Bleibestimmung in biologischen Materialien beschrieben. Auch Anreicherungsmethoden mit Carbamaten in MIBK wurden mit Erfolg eingesetzt. Allerdings werden hier auch die Boot-Technik und das Delves-System und seine Modifikation weitaus mehr angewendet, da sie nur geringen zusätzlichen Aufwand erfordern und für manche analytischen Aufgaben (z.B. Blutanalyse) sehr geeignet sind (100,277,290-291).

Da Blei häufig in sehr geringen Konzentrationen bestimmt werden muß, reicht die mit normalen Flammen erzielbare Nachweisgrenze häufig nicht aus. Hier bieten sich dann flammenlose Atomisierungsverfahren, besonders die Graphitrohrküvette an. Gewisse Schwierigkeiten bereit dabei die relativ hohe Flüchtigkeit des Bleis; je nach Bindungsart und Matrix läßt es sich nur bis etwa 400-700°C verlustfrei thermisch vorbehandeln.

Dadurch können chemische Vorbereitungs-Schritte und / oder die Verwendung eines Untergrundkompensators erforderlich werden. Die Nachweisgrenze für Blei in der Graphitrohrküvette liegt bei 2. 10^{-12}g.

Die Trennung und Anreicherung der Schwermetalle als Carbamaten (darunter die zu bestimmenden Elemente Blei und Quecksilber) aus der Plazenten-Aufschlußlösungen mit Hilfe des Trennsäulensystemes und die Überführung zu einer 10 ml-MIBK-Lösung wurde im Abschnitt 6 beschrieben. Dadurch wurden der relativ hohe Salzgehalt und hohe Konzentration an gelösten organischen Substanzen und Schwefelsäure zuverlässig entfernt.

Beim Arbeiten mit der Graphitrohrküvette ist man in der Regel bestrebt, die Zersetzungstemperatur so hoch zu wählen, daß man den größten Teil der störenden Matrix (Salze,Säuren) entfernen kann (185,187). Diesem Bestreben steht die relativ hohe Flüchtigkeit von Elementen wie Blei und Quecksilber entgegen. Setzt man diese Elemente jedoch in Form schwerflüchtiger Verbindungen, so kann man die Zersetzungstemperatur oft erheblich erhöhen.

Das Trennung-Anreicherungsverfahren ist deshalb hier besonders wichtig, da die Überführung des Bleis und anderer Schwermetalle in eine schwerflüchtige Verbindung (Carbamat) eine beträchtliche Erhöhung der Zersetzungstemperatur erlaubt und somit auch die Fehler durch den Einfluß der Bindungsform auf die Messung vermieden werden können.

Methodik

Die Arbeitstechnik wurde hinsichtlich Störmöglichkeiten und Depressionseffekte vor der Bestimmung eingehend untersucht. Durch eine zweckmäßige Wahl des Temperaturprogrammes und der Atomisierungstemperatur wurden einwandfreie Bleisignale erhalten. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die FAAS-Bestimmung des Bleis sind aus der Tabelle 32 bzw. 33 ersichtlich.

Nach dem Routineverfahren kann man nur zuverlässig arbeiten, so lange die Analysenwerte für die Auswertung im linearen Teil der Eichkurve liegen. Deshalb müßten die Messungen hier innerhalb des Bereiches 0 - 25% Ext. erfolgen. Die Analyse wurde selbstverständlich mit Untergrundkompensator durchgeführt und durch Mehrfachbestimmungen und einen Widerfindungsrate-Test gesichert.

Die kürzwellige Lage von 283,3 nm der zur Messung benutzten Atomlinie ist stärker streulichtempfindlich, so daß die Anwendung des Deuteriumkompensators sehr nützlich ist, zumal hierbei keine Einbüße im Signal/Rausch-Verhältnis auftritt, da die Strahlungsintensität der Deuteriumlampe bei 283 nm schon sehr gut ist (187).

Die zu untersuchenden Probenlösungen und die zur Eichung des Bestimmungsverfahrens verwendeten Standardlösungen müssen annähernd Matrixisoform sein, das heißt, mindestens das zu bestimmende Element in der gleichen Beindungsform zu haben. Deshalb wurde hier zur Eichung der Analyse eine 10 ppm-Bleicarbamat-Stammlösung benutzt, die wie bei den Probenlösungen durch das Trennsäulensystem gewonnen worden ist.

Die Analysengeräte sind dieselben wie im Abschnitt 5.1. berichtet. Die Inbetriebnahme des AAS-Geräts, der Graphitrohrküvette und des Untergrundkompensators erfolgte nach den ausführlichen Bedienungsanleitungen. Für den Schreiber wurde der Bereich 10 mV ausgewählt, da damit ein optimales Verhältnis von maximaler Verstärkung zu Untergrundschwankungen zu erhalten ist.

Die Pipettenspitze, Reaktionsgefäße und Polyäthylenflaschen wurden wegen der großen Kontaminationsgefahr vor der Benutzung in verd. Königswasser-Mischung gekocht und danach mit demineralisiertem, destilliertem Wasser sorgfältig gewaschen. Die Vorratsflaschen müssen gegen das organische Lösemittel beständig sein: die Verwendung von MIBK und dickwandige 20 ml-Polyäthylenflaschen mit Schraubverschluß hat sich gut bewährt. Für die Bleibestimmung wurde außerdem eine Addition von 20% Menge Essigsäure zu den Standard- und Probenlösungen angewendet, da diese Mischung auch etwa 2 bis 3% wäßrige Restlösung lösen kann.

Arbeitsvorschrift

Die Bestimmung wurde im Routineverfahren durchgeführt und die Ergebnisse durch einen Widerfindungsrate-Test geprüft. Die aliquoten Mengen der 10 ml-MIBK-Carbamatenlösungen wurden (1+1) mit MIBK in Reaktionsgefäßen verdünnt. Eine Addition von 20% Menge Essigsäure wurde wie für die Standardlösungen vorgenommen. Diese Arbeitsweise erlaubte eine störungsfreie Analyse bei maximal anwendbarer thermischer Zersetzungsstufe (490°C) für Blei als Carbamat in solcher Matrix. Die Untergrundkompensation beseitigte eventuelle unspezifische Absorption. Nach Beendigung der Atomisierung wurde 1/2 Min. gewartet, bevor eine weitere Einspritzung vorgenommen war.
Reagenzien: Blei-Stammlösung = Titrisol (1g Pb. l^{-1}).
Bleicarbamat-Stammlösung = 100 ml 1 ppm Bleilösung (+ 1ppm Fe + 0,2% Natriumzitrat-2-hydrat) wurden wie für die Probenlösungen durch das Trennsäulensystem in 10 ml-MIBK-Bleicarbamat-Stammlösung überführt.
Bleilösungen = 61,25 bis 750,0 ppb als Carbamat in MIBK durch Verdünnung der Bleicarbamat-Stammlösung.
Blindlösung = 100 ml 0,2% Natriumzitrat-2-hydrat-Lösung wurden wie vorher durch das Trennsäulensystem in einer 10 ml-MIBK-Blindlösung überführt und wie die Probenlösungen vorbehandelt.
Blindwert: vernachlässigbar.
Optimaler Arbeitsbereich: 0,125 - 0,500 ppm Pb (Standardkurve Abb. 19).

Der Bleigehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken-und Frischmaterials gibt Tabelle 36 wieder. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereiche im Trocken- und im Frischmaterial sind in Tabelle 37 zusammengefaßt und das Ergebnis des Wiederfindungsrate-Tests ist aus Tabelle 35 ersichtlich.

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Absorption einer Standardlösung, die aus einer reinen wäßrigen Pb-Lösung durch das Trennsäulensystem gewonnen wurde, und einer gleichermaßen behandelten Standardlösung, die aus einer Pb-

Lösung mit Matrixisoformierung (100 ml 1 ppm pb + 1 ppm Fe + 0,2% Natriumzitrat-2hydrat) stammte, festgestellt. Deshalb ist es anzunehmen, daß durch die beschriebene Matrixmodifikation an dem Trennsäulensystem der Einfluß dritter Partner stark reduziert wird.

Resultate und Diskussion

Eine geeignete Methode zur Bestimmung von Spurenelementen im Menschen bzw. in der Umwelt ist die flammenlose AA-Spetroskopie, deren Empfindlichkeit ausreicht, um Elemetkonzentrationen im ppb-Bereich zu messen.

Bei der Bestimmung von toxischen Elementen wie Blei und Quecksilber in biologischem Materialien sind leider die Nachweisgrenzen bei weitem nicht so günstig, wobei Extraktions- und Anreicherungsmethoden oft eingesetzt werden müssen. Die hier beschriebene Arbeitsweise hat viele Vorteile für die Bleianalyse in Biomatrices. Das Verfahren dürfte auch außer Quecksilber für die Bestimmung von weiteren Schwermetallen von Interesse sein. Durch das simultane Funktionieren von mehreren Trennsäulen wird diese Prozedur nicht zeitraubend und beim sauberen Arbeiten kann man die Kontaminationsgefahr weitgehend verringern. Die Methode ermöglicht bei gleichzeitiger Anreicherung bzw. Erhöhung der Empfindlichkeit sauberen Atomisationspeaks. Dadurch wird es möglich, Standardlösungen bzw. Routineverfahren einzusetzen. Das Ergebnis des Wiederfindungsrate-Tests zeigt, daß die Methode für die Bleianalyse in biologischem Material ausreichende Reproduzierbarkeit und Genauigkeit besitzt.

Wir haben durch die beschriebene Arbeitsweise in normalen bluthaltigen Humanplazenten aus dem Raum Berlin (West) einen Bleigehalt von 0,914 $\pm$ 0,178 ppm im Trocken-bzw. 0,157 $\pm$ 0,029 ppm im Frischmaterial gefunden. Daraus ist wohl eine gewisse Bleikontamination menschlicher Plazenten im Berliner Gebiet zu ersehen, obwohl sehr unterschiedliche Bleiwerte für die menschliche Plazenta in der Literatur zu finden sind (21-22,

260-262). Sicherlich tragen die eventuellen Verkalkungen der Plazenten sehr stark zur Erhöhung ihres Bleigehaltes bei (262). Allerdings sind hier die vorliegenden Mittelwerte für die gesamte Humanplazenta repräsentativ.

Das biologische Interesse für Schwermetalle, insbesondere Blei, ist seit langem auf die toxischen Eigenschaften der industriellen Abfallproduktion in ihrer Wirkung auf Mensch und Tier gerichtet. Den für den Fetus durch Schwermetalleinlagerung in Plazenta und fetale Organe entstehenden Gefahren wurde bisher wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Die sich daraus ergebenden Störungen in den Stoffwechselmechanismen sind derzeit noch nicht abzusehen. Nach Popescu (292) tritt Blei durch die menschliche Plazenta und führt beim Embryo zu Schäden an Leber und Nieren. Am Kückenembryo ließen sich mit Blei Mißbildungen hervorrufen (293).

Tabelle 32 Geräteeinstellung zur FAAS-Bestimmung von Blei und Quecksilber

Parameter	Blei	Quecksilber
Wellenlänge (nm)	283,3	253,6
Spalt (nm)	0,7	0,7
Schreiber (mV)	10	10
Lampe	HKL	HKL
Meßart	Ext/Just	Ext/Just
DUK	An	An
Gasstop	Aus	Aus

Tabelle 33 Programmierung der Graphitrohrküvette zur FAAS-Bestimmung von Blei und Quecksilber

Programmierung	Blei	Quecksilber
Trocknung (s)	30	30
Therm. Zersetzung (s)	30	30
Atomisierung (s)	20	10
Programm	5	3
Spannung (V)	7	7
Einspritzmenge (μl)	25	20
Spülgas*	N_2	N_2
GR-Typ	Normal	Normal
Ausheizen (s)	10	10

* Nachgereinigter Stickstoff, Vordruck 2 atü

Tabelle 34 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der AAS-Bestimmung des Bleigehaltes nach dem Routineverfahren

Standardlösungen (ppb Pb)	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwerte (%)
62,5	2,4	2,5	2,5
125,0	5,2	5,0	5,1
250,0	9,9	10,2	10,1
375,0	13,5	14,2	13,9
500,0	19,0	19,8	19,4
625,0	20,1	21,0	20,6
750,0	26,5	25,4	26,0

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

Tabelle 35 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Lösungen	Zusatz (µg Pb /ml)	Gesamter Bleigehalt (ppm)	Wiederfindungsrate (%)
A	-	0,507	-
A 50%	-	0,254	102,0
A 50%	0,125	0,379	99,8
A 50%	0,250	0,504	98,7
A 50%	0,500	0,754	95,5

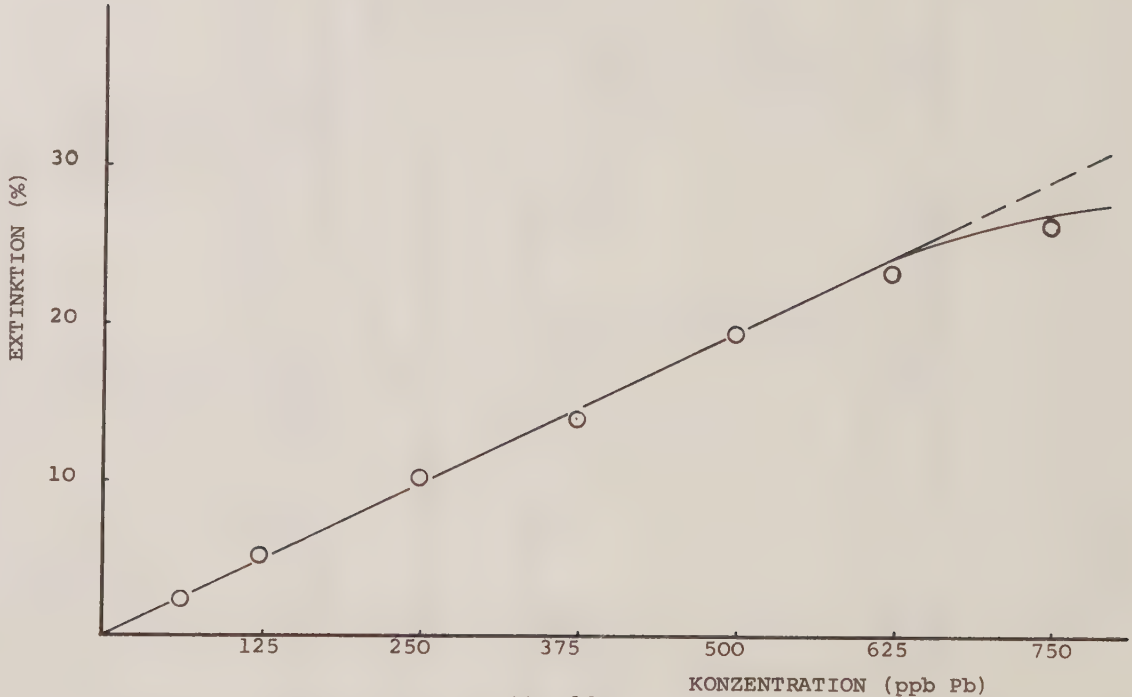

Abb. 19

Standardkurve für die FAAS-Bestimmung des Bleigehaltes nach dem Routineverfahren

Tabelle 36 Bleigehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenta	Routineverfahren Mitt. Ext.* (%)		Mittelwerte (%)	Einspritz-lösungen (ppb Pb)	Plazenta-lösungen (ppb Pb)	Trocken-material (ppm)	Frisch-material (ppm)
F	7,8	7,2	7,5	97,1	19,4	0,971	0,166
G	7,2	7,6	7,4	95,8	19,2	0,958	0,164
H	10,4	9,2	9,8	126,8	25,4	1,268	0,217
I	9,8	9,4	9,6	124,3	24,8	1,242	0,213
J	9,9	9,1	9,5	123,0	24,6	1,230	0,211
K	8,5	8,1	8,3	107,4	21,5	1,074	0,184
L	9,2	9,0	9,1	117,8	23,6	1,178	0,202
M	7,9	7,5	7,7	99,7	19,9	0,997	0,171
N	8,3	8,1	8,2	106,1	21,2	1,061	0,182
O	7,6	7,8	7,7	99,7	19,9	0,997	0,171
P	5,6	5,8	5,7	73,8	14,8	0,737	0,126
Q	4,8	4,4	4,6	59,5	11,9	0,595	0,102
R	7,3	7,9	7,6	98,4	19,7	0,984	0,169
S	5,6	5,4	5,5	71,2	14,2	0,712	0,122
T	6,9	6,5	6,7	86,7	17,3	0,867	0,149
U	6,8	6,2	6,5	84,1	16,8	0,841	0,144
V	4,1	4,3	4,2	54,4	10,9	0,544	0,093
X	5,0	5,4	5,2	67,3	13,5	0,673	0,115
Y	4,0	4,6	4,3	55,7	11,1	0,557	0,095
Z	6,0	6,2	6,1	79,0	15,8	0,790	0,135

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

Tabelle 37 Blei- und Quecksilbergehalt der normalen reifen bluthaltigen Humanplazenta

Statistische Auswertung	Spuren-elemente	Trockenmaterial (ppm)		Frischmaterial (ppm)	
		MG	KB	MG	KB
$n = 20$					
$S = \sqrt{\frac{\sum_1^n \delta_i^2}{n-1}}$	Pb	0,914 ± 0,178	0,544-1,268	0,157 ± 0,029	0,093-0,217
	Hg	1,671 ± 0,216	1,240-2,338	0,286 ± 0,037	0,212-0,401
$E = \bar{x} \pm \frac{t.S}{\sqrt{n}}$					

* MG = mittlerer Gehalt KB = Konzentrationsbereich

6.1. Anwendung der flammenlosen Atomabsorptionsspektralphotometrie zur Bestimmung des Quecksilbergehaltes

Der Schwerelementbelastung der Umwelt wird in der heutigen Zeit eine wachsende Aufmerksamkeit geschenkt. Im Vordergrund stehen bekanntlich die toxischen Metallen Quecksilber, Cadmium und Blei. Wegen seiner großen Flüchtigkeit und Toxizität nimmt aber Quecksilber und seiner sich in die Biosphäre leicht bildender, metallorganischer Verbindungen eine Sonderstellung unter der umweltrelevanten Stoffen ein (159,190,233,294). Da eine Vielzahl natürlicher und künstlicher Quellen zur Erhöhung des Quecksilbergehaltes der Luft, Böden und Gewässer kontinuierlich beiträgt, gibt in jüngster Zeit die konsequente, ständig zunehmende Anreicherung dieses Elementes in der Nahrungskette Anlaß zur Besorgnis.

Obwohl die Giftigkeit des Quecksilbers und seiner Verbindungen seit dem Altertum bekannt ist, schreckten erst die schweren Unfälle in der japanischen Minamatabucht in den 50 er Jahren die Menschheit weltweit auf. Mehrere chemische Werke kontaminierten das Abwasser mit löslichen Quecksilberverbindungen, die in Minimata-Bucht und letztlich in die menschliche Nahrungskette gelangten. Die "Minamata-Krankheit", eine schwere Nervenkrankheit, die sich je nach dem Grad der Vergiftung in unterschiedlichen Symtomen äußert, ließ bis 1966 insgesamt 121 Personen (darunter 46 Todesopfer) erkranken (233,294).

Es gibt heute bereits eine Fülle von Daten über die natürlichen Kreisläufe von Schwerемetallen wie Quecksilber (10,257,295). Diese Gleichgewicht zwischen Abbau und natürlicher Synthese wird durch die industriellen Aktivitäten des Menschen gestört. Zum Beispiel gelangen quecksilberhaltige Industrieabwässer und-abfälle in die Gewässer und schließlich in die Schlammschicht am Grund von Seen und Teichen; dann entstehen durch die Lebenstätigkeit anaerober Organismen letzten Endes organische Verbindungen

wie CH_3-Hg^+ und $(CH_3)_2$ Hg. Die Flüchtigkeit der Dimetylverbindung bewirkt den Übergang in das Wasser. Da diese Verbindung schneller gebildet wird, als andere Organismen sie abbauen, kann sie sich in Fischen und Schalentieren anreichern und vom Menschen mit der Nahrung aufgenommen werden und auf diese Weise eine Gefahr für die öffentliche Gesundheit darstellen. In der Minamata-Bucht wurden Hg-Rückstände von 5-20 ppm in Fischen gemessen. Aufgrund seiner Lipidlöslichkeit (hydrophobe Methylgruppen) greift das Dimethylquecksilber vor allem das Zentralnervensystem an.

Die Toxizität des Quecksilbers hängt sehr stark von der Art seiner chemischen Bindung und der Art der Aufnahme durch den Organismus ab. Wenn auch metallisches Hg, über die Verdauungsorgane inkorporiert, praktisch ungiftig ist , sind dagegen eingeatmete Hg-Dämpfe zu über 80% von den Schleimhäuten rasch absorbiert und deswegen gar nicht ungefährlich. Große Wiedersprüche herrschen in der Literatur bezüglich Aufnahme löslichen anorganischen Quecksilberverbindungen, aber wie man aus Unglücksfällen ableiten darf, Dosen ab ca. 100 mg führen meist zum Tod. Am weitaus giftigsten bzw. biologisch aktivsten ist wie erwähnt Hg in metallorganischer Bindung. Die aktuelle umweltrelevante Biochemie des Quecksilbers interessiert sich deshalb insbesondere für seine mobilen Phasen: der Metalldampf und bestimmte metallorganische Verbindungen - die Formen also, in denen letztlich alles anthropogene Quecksilber in unserer Biosphäre angereichert wird.

Jährlich werden auf der ganzen Erde etwa 2.10^4t Hg durch industrielle Produktionsprozesse freigesetzt. Dies erscheint zwar sehr wenig, wenn man weiß, daß im Jahr 3.10^4 t mit dem Regen auf die Erde gelangen und daß 7.10^7 t Hg in den Ozeanen vorhanden sind. Das Problem liegt in der durch menschliche Tätigkeiten ungleich gewordenen Verteilung von Hg, wodurch toxische Konzentrationen erreicht werden können. Den auf natürlichen Vorgängen beruhenden Kreisläufe, die über lange Zeiträume praktisch konstante Kontaminationen verursachen, überlagern sich vom Menschen ausgelöste Hg-Freisetzungen. Die vermutlich größte Teil des vom Menschen mobilisierten Quecksilbers sind Verluste bei der industriellen Herstellung und

Verarbeitung. Schätzungen ergeben, daß etwa ein Drittel des in verschiedenen Industriezweigen umgesetzten Quecksilbers ins Wasser oder in die Atmosphäre gelangt(220 t im 1971 in der BRD, Tabelle 38).

Obgleich die Hg-Gehalte von fossilen Brennstoffen (Kohle, Braunkohle) im allgemeinen nur sehr gering ist, ergibt sich bei der Verbrennung trotzdem eine recht beachtliche Menge Hg, die nahezu vollständig mit dem Abgas in die Umgebung abgegeben wird (296-297). Bei der Verbrennung oder Erhitzung von Rohstoffen werden etwa 40 t Hg pro Jahr in der BRD in die Atmosphäre freigesetzt (233). Aufgrund seiner hohen Dichte (relativ kurze Halbwertzeit) kehrt meist davon aus der Atmosphäre auf die Erdoberfläche zurück, wird von der oberen Bodenschicht resorbiert u. reagiert vermutlich zuerst mit organischen Bestandteilen der Böden, ehe es größtenteils zu schwerlöslichen Verbindungen (HgS, HgSe) remineralisiert wird. Somit wird das in die Atmosphäre freigesetzte Quecksilber mit großer Wahrscheinlichkeit zu einen hohen Prozentsatz mit den belebten Bodenschichten angereichert. Der größte Teil des uns gefährdenden Quecksilbers rührt also aus den Abgase bzw. Abwässern der Industrieballungsgebiete her. Aber da viele Faktoren dieser Problematik weitaus unbekannt bleiben, sind alle Aussagen über die Vorgänge um das Quecksilber in natürlichen Systemen äußerst unbestimmt. Trotzdem ist den Gewässern dabei als Sammel- und Reaktionsbecken eine Art Schlüsselstellung zuzuschreiben (298).

Das Methylquecksilber wird entweder von den Sediment-Bakterien gebildet oder in der Nahrungskette. Vorausgesetzt, daß keine Hg-Verbindungen mehr zum Pflanzenschutz eingesetzt werden, die Hauptquelle für die Aufnahme von Hg mit der Nahrung sind Fische, Muscheln und Krebse. Etwa 90% des in den Fischen enthaltenen Hg entfällt auf Methylquecksilber. Einen relativ hohen Hg-Gehalt weisen Tunfische und Schwertfische auf (190, 299-300). Es liegen jedoch keine Anhaltspunkte vor, daß dies durch eine erst neuerdings einsetzende Kontamination bedingt ist. Weltweitgesehen haben 99% der gegenwärtig

gefangenen Fische einen Hg-Gehalt von nicht mehr als 0,5 ppm.

Bei Personen mit einem hohen Fischverzehr aus dem Eriesee (USA), wurde eine durchschnittliche Hg-Konzentration im Haar von 3,7 ppm festgestellt gegenüber 0,9 ppm bei Personen die keine Fische aufnehmen. Bei der Minimata-Krankheit wurde eine Hg-Konzentration in Haaren der Patienten zwischen 52 und 570 ppm ermittelt. Die niederste Konzentration von Hg im Blut, bei der noch keine Symtome einer Hg-Vergiftung beobachtet wurden, war 0,2 bzw. 0,4 ppm in den Erythrozyten und 60 ppm im Haar. Auf Grund vieler Beobachtungen wurde von einer WHO / FAO-Komission als vorläufige "annehmbare Aufnahme" 0,3 mg Hg/Woche, davon nicht mehr als 0,2 mg in Form von Methylquecksilber, festgesetzt (4,190). Dies entspricht einer Tagesaufnahme von 43 µg Hg bzw. von 0,6 µg/kg Körpergewicht und einer Hg-Konzentration von 0,02 ppm im Blut bzw. 0,6 ppm im Haar. 95% aller Personen haben allerdings eine Hg-Konzentration im Blut unter 0,04 ppm.

$^{203}Hg(CH_3)_2$ erscheint schon kurze Zeit nach der Aufnahme per os in den Erythrozyten. Etwa 50% der Dosis wird von der Leber aufgenommen, 10% durch das Gehirn, das somit große Mengen Methylquecksilber speichert (t/2 etwa 70-74 Tage). In den Faeces werden in den ersten Tagen 3 - 4% der Dosis ausgeschieden, später etwa 1% am Tag. Durch die Niere werden je Tag nur etwa 0,1% der Dosis ausgeschieden. Zwischen dem Hg-Gehalt der Haare, seine Konzentration im Blut (insbesondere in den Erythrozyten) und der Höhe der Hg-Aufnahme besteht eine gewisse Korrelation.

Hg^{2+} und organische Hg-Verbindungen reagieren mit den SH- oder S-Gruppen von Proteinen und verändern dadurch die spezifischen Funktionen der Proteine im Organismus. Sie reagieren weiterhin auch mit Pyrimidinen, Purinen,Nukleosiden, Nukleotiden und Nukleinsäuren (daher teratogene Effekte und Chromosomenschäden). Eine erst kürzlich gemachte Beobachtung spricht für die notwendige Gegenwart geringer Se-Gehalt, da es Quecksilber und andere toxischen Schwermetalle in Organismen bindet (antagonistische Wirkung) (4,14,301-302). Die Tat-

sache, daß Hg^{2+} eine große Affinität zu SH-Gruppen besitzt, wird als Ausgangspunkt für den Einsatz vom Komplexbildner als Gegengift des Quecksilbers benutzt.

Es wird gewarnt, werdende Mütter vor dem Genuß von Fischen aus Binnen- und Küstengewässern zu bewahren, da sehr leicht die plazentale Sperrzone durch Methylquecksilber durchbrochen wird, so daß eine Anreicherung im Fetus beobachtet ist (303). Unter den Minamata-Opfern befanden sich 20 Neugeborene mit kongenitalen Defekten, obwohl die Mütter selbst keine Vergiftungserscheinungen zeigten. Offensichtlich birgt nicht nur die Empfindlichkeit des Ungeborenen an sich, sondern gerade auch die besondere Fähigkeit wachsenden Gewebes, Quecksilber stärker zu speichern, besondere Gefahren für die Kinder. Schon während der Schwangerschaft, also, kann das Methylquecksilber in den kindlichen Organismus eintreten (258). Das Blut von Neugeborenen enthielt viel mehr Quecksilber als das der Mutter. Tierversuche ließen auch Chromosomenschäden beobachten. Wegen möglicher pränataler Schädigungen und unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Entfernung von Hg-Verbindung aus Lebensmitteln schwierig ist, werden Grenzwerte für Nahrung und Wasser der WHO vorgeschlagen.

Mit Ausnahme der Arbeiten von Thieme und Mitarb. (23-24) wird kaum den Gefahren einer Anreicherung von Quecksilber und anderen toxischen Schwermetallen in den menschlichen Plazenta Aufmerksamkeit zugewendet. Sie haben mittels der NAA und AAS die Spurenelement-Zusammensetzung (darunter Hg) der menschlichen Plazenta von verschiedenen geographischen Regionen untersucht. In den Gebieten München, Bayerischer Wald und Altötting wurden entsprechende Quecksilbergehalte von 0,10, 4,2 und 0,045 ppm in gefriergetrockneten Plazentakotyledonen ermittelt. In menschlichen Plazenten der stark kontaminierten Umwelt von Großraum Essen wurde ein Mittelwert von 0,073 ppm im Trockengewicht erzielt. Für den stark erhöhten Quecksilberwert für den Bayerischen Wald konnten die Autoren keine Erklärung geben.

Der Bestimmung kleiner Hg-Menge in biologischem Material kommt in der Toxikologie große Bedeutung zu, und ferner bei

der Verfolgung des Hg-Spiegels in biologischen Flüssigkeiten und Organen von Hg-Dämpen ausgesetzten Personen und von Patienten, die mit organischen Hg-Präparaten behandelt wurden. Infolge der zunehmenden Verwendung von Quecksilber in Pflanzenschutzmitteln hat die Hg-Bestimmung auch in der Landwirtschaft und im Obstbau wachsende Bedeutung (198). Es bedarf kaum der Begründung dafür, daß die Nachfrage nach Methoden für die Hg-Analyse in Tieren-, Pflanzen- und Umweltmaterialien in den letzten Jahren mehr und mehr an Aktualität gewinnt.

Zur quantitativen analytischen Bestimmung von Quecksilberspuren in biologischen und Umweltmaterialien, Pflanzen, Tieren und Lebensmitteln werden vorwiegend die spektralphotometrische Bestimmung mit Dithizon (198) und die Atom-Absorptions-Spektroskopie (24,131,167,240,296,298,304-311) herangezogen. Daneben steht noch die Neutronen-Aktivierungs-Analyse (23-24,312-313) als Analysenmethode im Gebrauch. Katalytische (200) und Röntgenfluoreszenz-Analysenmethoden (238) spielen keine Rolle.

Die Hg-Bestimmung wurde früher meistens spektralphotometrisch mit der Dithizonmethode durchgeführt. Wegen des geringen Aufwandes und des besonderen Vorteils, daß sie praktisch in jeden Laboratorium ausführbar ist, wird diese Analysenmethode noch oft angewendet. Die Nachteile sind aber große Zeitaufwand und das Arbeiten mit gesundheitsschädlichen Lösemitteln.

Außerdem ist die Empfindlichkeit der Dithizonmethode in vielen Fällen nicht ausreichend, um die geringe Hg-Menge zuverlässig zu erfassen.

Für die Messung von Hg-Spuren in biologischen Materialien ist oft die NAA geeignet. Einer der Vorteile dieser Methode ist, daß Analysenfehler ausgeschlossen werden können, die bei anderen Verfahren durch die chemische Aufbereitung der Proben entstehen. Die Nachteile sind die materiellen und zeitlichen Aufwände.

Das Nachweisvermögen der AAS mit einer Flamme als Absorptionsvolumen reicht für die Analyse von Hg-Spuren, die bei chemischen Anreicherungsprozessen erhalten werden, oft nicht aus. Ursache dafür sind u.a. die ungenügende Empfind-

lichkeit und der verhältnismäßig hohe Verbrauch an Probenmaterial. Insbesondere für die Bestimmung des Quecksilbers in biologischen Proben und zur Überwachung der Umweltverschmutzung ist die Flammen-AAS nicht gerade geeignet. Deswegen wurden verschiedene Verfahren für flammenlose Analyse des Quecksilbers entwickelt.

Das erfolgreichste und heute am meisten eingesetzte Verfahren zur Hg-Spurenbestimmung wurde von Poluektov u. Mitarb. (1964) vorgeschlagen und später von Hatsch und Ott (314) eingehend untersucht. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens ist um etwa drei Größenordnungen besser als die mit der Flamme erreichbare (298,315-316). Die ersten kommerziellen Zusatzgeräte zur automatischen Hg-Bestimmung sind schon bereits auf dem Markt zu finden (z.B. Hg-Hydrid-System MHS-1 von Perkin-Elmer).

Dennoch sind die verschiedenen Varianten des Kalt-Dampf-Verfahrens von Hatsch und Ott, wie aus der Literatur zu ersehen ist (290,315) nicht so praktisch und unproblematisch als vielfach angenommen wird. Wie bei allen Analysenmethoden, wird über Störungsmöglichkeit berichtet. Vor allem spielen die Störungen durch flüchtige Begleitstoffe, die Gefahr des Auftretens unspezifischer Lichtverluste und die Menge bzw. die Qualität der Reagenzien eine entscheidende Rolle. Ganz abgesehen davon daß dieses Verfahren in Gegenwart einer leicht reduzierbaren Matrix lediglich versagt und daß ein weiteres, nicht gerade billiges Zusatzgerät fordern. Besonders bei der Hg-Bestimmung im biologischen, chemisch keineswegs definierten Material, wie bei unserer Untersuchung in Humanplazenten der Fall ist, treten große Schwierigkeiten, wenn Analysenverfahren angewandt werden sollen, die an definiertem Untersuchungsmaterial erprobt sind. Die Analysenvorschriften lassen sich kaum direkt übertragen und es muß immer wieder kontrolliert werden, ob durch das biologische Untersuchungsmaterial Fehler eingeschleppt werden.

Die hier angewendeten Analysenmethoden sollen im Prinzip aus Kapazitätsgründen auch in Laboratorien mit nur einer AA-Grundausstattung durchfürbar sein. Nach Massmann (290) läßt

sich Hg trotz seiner Flüchtigkeit sehr gut in einer kalten oder nur schwach geheizten Graphitrohrküvette bestimmen. Durch den Zusatz von Ammoniumsulfat (130), Wasserperoxid (310) und anderen Reagenzien zur eingespritzten Probe können sich in den Graphitrohr schwerflüchtige Verbindungen bilden, die sodann das Hg erfaßbar machen. Als weitere Verfahren zur Hg-Bestimmung im Graphitrohr sind die Verwendung von Goldkathoden (296) und mit Gold beschichteten Graphitofen (317) zu erwähnen.

Da sich die flammenlose Anregung in der Graphitrohrküvette in Vorversuchen als geeignet zur Bestimmung von Hg als Carbamat in einer MIBK-Lösung erwiesen hatte, wurde sie zur Durchführung der Arbeit herangezogen. Dabei spielten der geringe apparative Aufwand, die Probenvorbereitung und -handhabung eine wichtige Rolle. Die Analysenmethode sollte aber auch die Kriterien der Zuverlässigkeit und Praktikabilität erfüllen.

Ein Trennung-Anreicherungsverfahren wird in der AAS meist dann angewendet, wenn die konzentration des interessierenden Elementes in der Probe für eine direkte Bestimmung zu niedrig ist oder wenn die Matrix zu komplex wird und die daraus resultierenden Störungen nicht mehr kontrollierbar sind. Hierfür dient das verwendete Trennsäulensystem (s. Abschnitt 6) sowohl zur Anreicherung als zur Abtrennung der Schwermetalle (Pb,Hg), da einerseits besonders bei der Hg-Bestimmung die Konzentration des zu bestimmenden Elementes sehr gering ist und andererseits es eine große Störanfälligkeit durch Rauch und Streulichtabsorption zeigt. Außerdem bringt das Verfahren eine Matrixisoformierung und die Überführung des Quecksilbers (sowie Pb) in eine bekannte, schwerflüchtige Verbindung mit sich. Die Tatsache, daß Hg^{2+} (und meistens Schwermetallionen) eine große Affinität zu S-Gruppen besitzt, wurde als Ausgangspunkt für den Einsatz des Carbamates als Komplexbildner benutzt. In den 10 ml-MIBK-Carbamaten-Stammlösungen sind außer Pb und Hg weitere Schwermetalle zu bestimmen; es ist nur eine Frage der Haltbarkeit der Carbamaten-Probenlösungen.

Die typische Flüchtigkeit des Quecksilbers und seine Verbindungen gestattet es nicht, in der Graphitrohrküvette hohe Veraschungstemperaturen anzuwenden. Die Überführung des Metalls durch das Trennung-Anreicherungsverfahren in einer schwerflüchtigen Komplexverbindung (Carbamat) erlaubt aber eine signifikante Erhöhung der Zersetzungstemperatur.

Methodik

Da die Beeinflussung der Hg-Bestimmung als Carbamat in der Graphitrohrküvette durch Störpartner und Depressionseffekte gering zu sein scheinte, konnte eine weitgehend störungsfreie Analyse mit sauberen Atomisationspeaks durchgeführt werden. Die Geräteeinstellung und die Programmierung der Graphitrohrküvette für die FAAS-Bestimmung des Quecksilbers weist Tabelle 32 bzw. 33 auf.

Bei der flammenlosen Analyse des Quecksilbers mit der Graphitrohrküvette ist aus verschiedenen Gründen der Linearitätsbereich der Eichkurve relativ klein. Dies erschwert die Anwendung des Routineverfahrens, da diese nur im linearen Meßbereich einsetzbar ist. Selbstverständlich wurde die Analyse mit Untergrundkompensator durchgeführt und durch Mehrfachbestimmungen und einen Wiederfindungsrate-Test gesichert.

Die Angaben für die Bleianalyse hinsichtlich Matrixisoformierung sind hierher zu übertragen. Es wurde gleichfalls zur Eichung der Methode eine 10 ppm- Quecksilbercarbamat-Stammlösung benutzt, die wie bei den Probenlösungen durch das Trennsäulensystem gewonnen wurde.

Die Analysengeräte sind dieselben wie im Abschnitt 5.1 berichtet. Die Inbetriebnahme der Geräte ist wie im Abschnitt 6.2 für Blei beschrieben.

Materialien und Reagenzien: Die gleichen Vorsichtsmaßnahmen gegen Kontamination wie für die Bleibestimmung sind hier getroffen. Obwohl Hg zu den Elementen zählt, die nur in geringer Konzentration in der Erdkruste vorkommen, ist wegen seiner Flüchtigkeit und konsequente Allgegenwärtigkeit die Gefahr eine Kontamination im Verlauf der Analyse nicht ganz

auszuschließen. Das verwendete Lösemittel (MIBK) wurde auf Verunreinigung geprüft. Im Gegensatz zur Bleianalyse wurde bei der Hg-Bestimmung keine Essigsäure-Addition zu den Lösungen angewendet.

Arbeitsvorschrift

Die Quecksilberbestimmung wurde im Routineverfahren durchgeführt und die Ergebnisse durch einen Wiederfindungsrate-Test geprüft. Die aliquoten Mengen der 10 ml-MIBK-Carbamate-Lösungen wurden unverdünnt gemessen. Die Arbeitsweise gestattete eine störungsfreie Messung bei maximal anwendbarer thermischer Zersetzungsstufe (230°C) für Hg als Carbamat in solcher Matrix. Eventuelle unspezifische Absorption wurde mit der Untergrundkompensation beseitigt. Nach Beendigung der Atomisierung wurde jeweils 1/2 Min. gewartet, bevor eine weitere Einspritzung vorgenommen wurde.
Reagenzien: Quecksilber-Stammlösung = Titrisol (1g Pb. l^{-1}).
Quecksilbercarbamat-Stammlösung = 100 ml 1 ppm Hg-Lösung (+ 1 ppm Fe + 0,2% Natriumzitrat-2-hydrat) wurden wie für die Probenlösungen durch das Trennsäulensystem in 10 ml-MIBK-Quecksilbercarbamat-Stammlösung überführt.
Quecksilberlösungen = 62,5 bis 750,0 ppb Hg als Carbamat in MIBK durch Verdünnung der Quecksilbercarbamat-Stammlösung.
Blindlösung = 100 ml 0,2% Natriumzitrat-2hydrat-Lösung wurden wie vorher durch das Trennsäulensystem in einer 10 ml MIBK-Blindlösung überführt.
Blindwert: Es wurde einen in der Nähe der Nachweisgrenze liegenden Blindwert (< 2,0% Ext.)gemessen; Aus der Eichkurve: 0,173 ppm Hg.
Optimaler Arbeitsbereich: 0,125 - 0,750 ppm Hg (Standardkurve Abb. 20).

Der Quecksilbergehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösung bzw. des einzelnen Trocken-und Frischmaterials gibt Tabelle 41 wieder. Die Mittelwerte und Konzentrationsbereich im Trocken- und im Frischmaterial sind in Tabelle 37 zusammengefaßt und das Ergebnis des Wiederfindungsrate-Tests ist aus

Tabelle 40 ersichtlich.

Resultate und Diskussion

Zunehmende Umweltbelastung und Toxität stellen extreme Anforderungen an die Überwachung der Schwermetallgehalte in der Biosphäre. Die Notwendigkeit der Erfassung von Hg in biologischen und Umweltmatrices steht deswegen außer Frage. Die routinemäßige Bestimmung von Hg in Geweben und Körperflüssigkeiten bleibt aber noch sehr schwierig und umbestritten. Dabei eignet sich besonders die flammenlose AAS, weil wegen des geringen Hg-Gehates in der Umwelt eine sehr empfindliche Analytik erforderlich ist.

Da das meist angewendete Verfahren zur Hg-Bestimmung,das Kalt-Dampf-Verfahren, auch störungsanfällig und zeitaufwendig sein kann, ist die Entwicklung und laufende Anwendung anderer Bestimmungssverfahren sehr wichtig. Wir stellen daher bei der Auswahl einer für die Hg-Bestimmung geeigneten Methode folgende Bedingungen: Hohe Empfindlichkeit, hinreichende Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit und möglichst geringe Kontaminationsgefahr. Die flammenlose AAS mit Hilfe der Graphitrohrküvette erfüllt meist die gestellten Bedingungen; auf Grund dieser Tatsache wurde hierfür eine Arbeitsvorschrift erarbeitet und erprobt. Allerdings läßt sich Hg infolge seiner Flüchtigkeit nicht ohne weiteres in der Graphitrohrküvette bestimmen. Das Element muß erst in eine schwerflüchtige Verbindung überführt und dann atomisiert werden. Das Arbeiten mit dem Trennsäulensystem ist deshalb geradezu ideal,weil neben der Trennung und Anreicherung des Elementes, eine Überführung in eine Komplexverbindung erfolgt.

Gegenüber dem Kalt-Dampf-Verfahren bietet die Hg-Bestimmung als Carbamat mit der Graphitrohrtechnik eine überzeugende Alternative, da viele der genannten Störmöglichkeiten und Aufwände hier nicht auftreten. Sicherlich stellt der Linearitätsbereich beinahe ein Problem dar (daß übrigens auch durch instrumentelle Krümmungskorrektur zu lösen ist), weil eine Krümmung der Eichkurve schon unterhalb 0,2 Extinktion auftritt.

Die Gründe dafür sind natürlich in der Flüchtigkeit des Elements und in der Schnelligkeit der Atomisation zu suchen. Nicht von unerheblicher Bedeutung für die Linearität der Eichkurve ist wohl die Aussprechzeit des Schreibers und die Anwendung von Stickstoff als Spüllgas. Es sollte daher weiter untersucht werden, in wieweit sich die hier beschriebene Methodik für die entsprechende Problemstellung eignet. Prinzipiell treten hier weit weniger Schwierigkeiten als bei anderen Hg-Analysenverfahren auf.

Dennoch kann man sich in der Spurenanalyse nie so absolut absichern, daß er jedem Vorwurf der Unzulänglichkeit entgehen kann. Beispiel dafür geben Ringuntersuchungen (u.a. 14,158) im Rahmen der Analyse von Quecksilberspuren in Lebensmitteln und Biomatrices. Die Mehrzahl aller Quecksilberbestimmungen mit verschiedenen Methoden liefert zu hohe Werte gegenüber dem wahren Gehalt. Das ließ zum Schluß kommen, daß die Höhe der Allgegenwartskonzentration des Quecksilbers (Laboratoriums-Luft,Reagenzien,Materialien) unterschätzt und nicht genügend durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen berücksichtigt wird. Reproduzierbare Ergebnisse garantieren in der Spurenanalyse also nicht unbedingt auch ihre Richtigkeit; eine sehr kritische Betrachtung jeder Arbeit ist deswegen unentbehrlich.

Unser Verdacht auf eine Belastung von Humanplazenten mit toxischen Schwermetallen im Berliner Raum ist in Anbetracht der Ergebnisse unserer Untersuchungen verstärkt worden, da die Umweltverschmutzung eines Gebietes sich auch in der Spurenelement-Zusammensetzung der menschlichen Plazenta widerspiegelt. Aufgrund der Insellage gilt diese Aussage besonders für Berlin, wo die im Stadtgebiet vorhandenen Müllablagerungsflächen und Abfallverbrennungsanlagen, sowie der dichte Verkehr und die Industrieabgase und-abwässer sehr stark zur Beeinflussung ihrer Umwelt beitragen.

Wir haben relativ hohe Werte für den Hg-Gehalt von Humanplazenten aus dem Raum Berlin erzielt: 1,671 $\pm$ 0,216 ppm im Trocken- bzw. 0,286 $\pm$ 0,037 ppm im Frischmaterial. Allerdings sind sie für die gesamte Plazenta repräsentativ und ferner niedriger als die von Thieme u. Mitarb. für den Bayerischen

Wald-Gebiet ermittelten Werte.

Wie bei allen Analysenverfahren, so mußte bei der hier beschriebenen Methode nach einer sorgfältig erarbeiteten Vorschrift verfahren werden. Die Eichung erfolgte mit Standardlösungen, die die Forderungen von Matrixisoformierung entsprechend erfüllten. Nicht zu überschätzen war dabei die Gefahr von Kontamination und Alterung der Stammlösungen. Die kommerziellen reinsten Reagenzien genügen oft kaum noch den Ansprüchen der extremen Spurenanalyse. Wir haben einen relativ hohen Blindwert erhalten, was eine gewisse Beeinflussung der Ergebnisse zur Folge hätte deuten können. Da es sich hier um eine Grundarbeit im Rahmen der Spurenanalyse in Humanplazenten handelt, die zeitlich begrenzt ist, kam von vorneherein eine absolut gesicherte Hg-Bestimmung nicht in Betracht. Anhand einer optimalen Probenvorbereitung, spurenfreier Reagenzien und sauberer Arbeiten können auf eine rasche, einfache Bestimungsweise recht gute Ergebnisse für den Quecksilbergehalt erzielt werden.

Die natürliche Verbreitung des Quecksilbers in Wasser, Luft und Biosphäre erreicht nur Konzentrationen im ppb-Bereich und darunter. Demgegenüber birgt die zunehmende Verwendung des Metalls in Industrie und Landwirtschaft die Gefahr einer Kontaminierung der Umwelt in sich, deren schreckliche Auswirkung der Öffentlichkeit zum ersten Male ins Bewußtsein gerückt wurde, als sich die Vorfälle in der Minamata-Bucht in Japan ereigneten. Dennoch wird fast kaum Beachtung den für den Fetus durch SChwermetalleinlagerung in Plazenta und fetale Organe entstehenden Gefahren geschenkt. Die sich daraus ergebenden Funktionsstörungen in diesen hoch stoffwechselaktiven Systemen sind derzeit noch nicht absehbar.

Tabelle 38 Verlust von Quecksilber in der Industrie in der BR-Deutschland (1971) nach A. Rauhut u. L. Wild (233)

Verwendungsgebiet	Verbrauch (t)	Verbrauch (%)	Emission (t)	Emission (%)
Chloralkali-Industrie	351	53,2	100	45,5
Chemikalien, Pharmazie	53	8,0	20	9,1
Schädlingsbekämpfung	47	7,1	30	13,6
Katalysatoren	44	6,6	?	-
Elektroindustrie	34	5,2	25	11,4
Schutzfarbe	30	4,6	25	11,4
Zahnlegierungen	22	3,3	?	-
Meßinstrumente	29	4,3	20	9,1
Sonstige	50	7,6	?	-

Tabelle 39 Gemessene Extinktionen zur Aufstellung der Standardkurve der FAAS-Bestimmung des Quecksilbergehaltes nach der Routineverfahren

Standardlösungen (ppb Hg)	Mittlere Extinktionen* (%)		Mittelwerte (%)
62,5	3,5	3,5	3,5
125,0	4,8	4,9	4,9
187,5	5,9	6,1	6,0
250,0	6,9	7,1	7,0
375,0	9,1	9,0	9,0
500,0	11,1	10,9	11,0
625,0	13,0	12,9	13,0
750,0	15,2	14,6	14,9

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

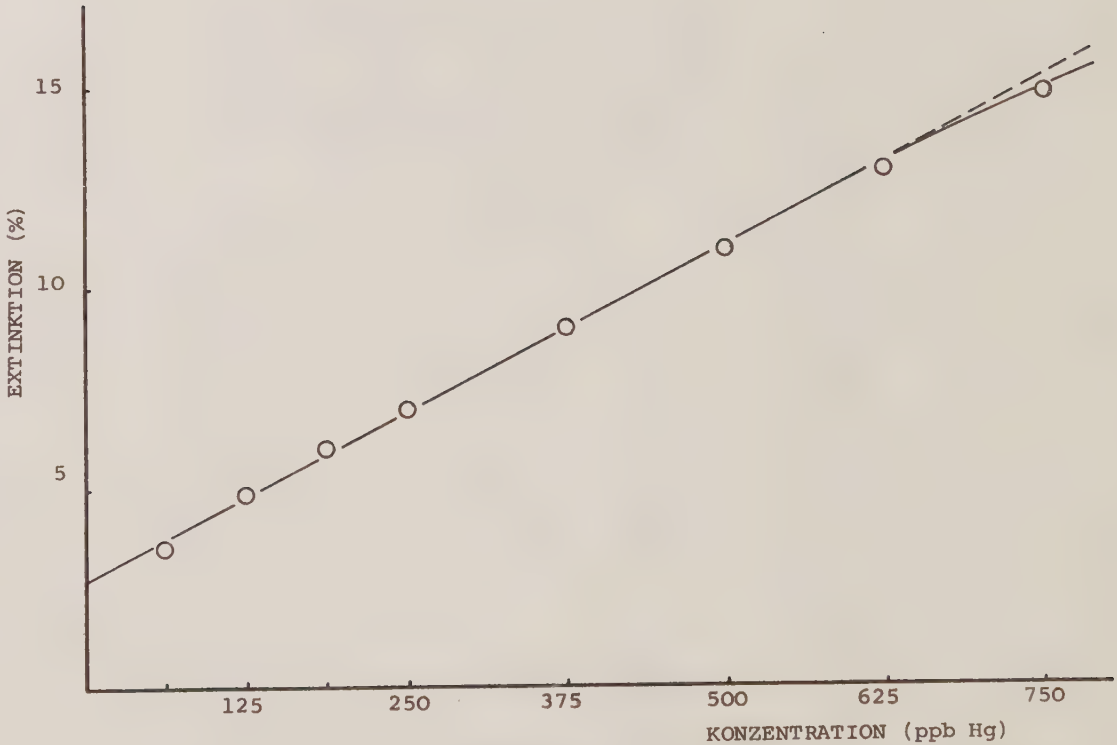

Abb. 20

Standardkurve für die FAAS-Bestimmung des Quecksilbergehaltes nach dem Routineverfahren

Tabelle 40 Wiederfindungsrate beim Zusatzversuch

Lösungen	Zusatz (µg Hg/ml)	Gesamter Hg-Gehalt (ppm)	Wiederfindungsrate (%)
A	-	0,264	-
A 50%	-	0,132	100,0
A 50%	0,075	0,207	101,6
A 50%	0,200	0,332	101,2
A 50%	0,325	0,457	100,8

Tabelle 41 Quecksilbergehalt der einzelnen Plazenta-Stammlösungen bzw. des einzelnen Trocken- und Frischmaterials

Plazenten	Routineverfahren Mitt. Ext.* (%)		Mittelwerte (%)	Einspritz-lösungen (ppb Hg)	Plazenta-lösungen (ppb Hg)	Trocken-material (ppm)	Frisch-material (ppm)
F	7,0	6,8	6,9	0,248	24,8	1,240	0,212
G	7,2	7,3	7,2	0,266	26,6	1,331	0,228
H	8,1	8,0	8,0	0,315	31,5	1,575	0,270
I	8,7	8,6	8,6	0,352	35,2	1,758	0,301
J	9,3	8,8	9,0	0,376	37,6	1,880	0,322
K	8,1	8,2	8,2	0,327	32,7	1,636	0,280
L	7,7	8,1	7,9	0,309	30,9	1,545	0,265
M	8,0	8,0	8,0	0,315	31,5	1,575	0,270
N	9,2	9,0	9,1	0,382	38,2	1,910	0,328
O	7,6	7,3	7,5	0,285	28,5	1,422	0,244
P	8,3	8,2	8,3	0,333	33,3	1,666	0,286
Q	7,0	6,9	7,0	0,254	25,4	1,270	0,218
R	7,5	7,6	7,6	0,291	29,1	1,453	0,249
S	9,7	9,7	9,7	0,419	41,9	2,094	0,359
T	10,1	9,7	9,9	0,431	43,1	2,155	0,369
U	8,6	8,2	8,4	0,339	33,9	1,697	0,291
V	8,6	8,0	8,3	0,333	33,3	1,666	0,286
X	8,0	7,9	8,0	0,315	31,5	1,575	0,270
Y	8,1	8,3	8,2	0,327	32,7	1,636	0,280
Z	10,6	10,4	10,5	0,468	46,8	2,338	0,401

* Mittlere Extinktionen von je drei Messungen

7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit werden hauptsächlich normale, bluthaltige Humanplazenten aus dem Berliner Raum an ihrem Spurenelementgehalt untersucht. Dabei werden nach einem angemessenen, einfachen analytischen Gang ebenfalls einfachste, geeignete Analysenmethoden eingesetzt, die aus Kapazitätsgründen auch in normalen klinisch-chemischen Laboratorien mit nur einer Grundausstattung durchgeführt werden können. Auf Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten wird ausführlich hingewiesen.

Im Kapitel 3 wird über ein modifiziertes,verbessertes Säureaufschlußverfahren berichtet, das zum ersten Male zum Aufschluß von Plazentamaterial angewandt wurde. Es wird gleichzeitig die Probennahme und -vorbereitung beschrieben. Hierdurch wurde eine Anzahl von 20 gesamten Humanplazenten aufgearbeitet.

Im Abschnitt 4.1 wird über die erstmalige Anwendung spektralphotometrischen Bathocuproinmethode zur Bestimmung des Kupfergehaltes von Humanplazenten gesprochen. Die verbesserte Arbeitsvorschrift, die Spezifitätsgründe und die Richtigkeit werden angegeben.

Abschnitt 4.2 handelt von der erstmaligen Anwendung einer verbesserten, kombinierten extraktiv-spektralphotometrischen Dithizon –Zincon-Methode zur Bestimmung des Zinkgehaltes von Humanplazenten. Die verbesserte Arbeitsvorschrift, die Spezifitätsgründe und die Richtigkeit werden mitgeteilt.

Abschnitt 5.1 berichtet über die Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Zinkgehaltes von Humanplazenten. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Abweichungen der Ergebnisse der Referenzmethode werden angegeben.

Im Abschnitt 5.2 ist von der Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Kupfergehaltes von Humanplazenten die Rede. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Abweichungen der Ergebnisse der Referenzmethode werden angegeben.

Im folgenden Abschnitt 5.3 wird die Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Cadmiumgehaltes von Humanplazenten erklärt. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Einsetzung der Additionsmethode werden beschrieben.

Der Abschnitt 5.4 handelt von der Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Mangangehaltes von Humanplazenten. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Einsetzung der Additionsmethode werden vorgelegt.

Im Abschnitt 5.5 wird über die Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Eisengehaltes von Humanplazenten berichtet. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Richtigkeit werden besprochen.

Im nachfolgenden Abschnitt 5.6 wird über die Anwendung der Flammen-Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Magnesiumgehaltes von Humanplazenten erklärt. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Richtigkeit werden beschrieben.

Im Kapitel 6.1 wird über die erstmalige Anwendung eines modifizierten Trennsäulensystems zur Trennung und Anreicherung von Schwermetallen der Plazenta-Aufschlußlösungen berichtet. Die entwickelte Arbeitsvorschrift , die Fehlermöglichkeiten und Richtigkeit werden vorgestellt.

Im Abschnitt 6.2 wird über die erstmalige Anwendung der flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Bleigehaltes in dem Eluat des Trennsäulensystems geredet. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeiten und die Richtigkeit werden angegeben.

Im Abschnitt 6.3 wird über die erstmalige Anwendung der

flammenlosen Atom-Absorptions-Spektralphotometrie zur Bestimmung des Hg-Gehaltes in dem Eluat des Trennsäulensystems berichtet. Die entwickelte Arbeitsvorschrift, die Fehlermöglichkeit und die Richtigkeit werden beschrieben.

Die gesamten Ergebnisse sind in Tabelle 42 zusammengefaßt.

Da es hier um eine Grundarbeit im Rahmen der Spurenanalyse in Biomatrices geht, die selbstverständlich zeitlich begrenzt ist, kam von vornherein statt einer Totalerhebung der Spurenelement-Zusammensetzung der Humanplazenta im Berliner Gebiet nur eine Stichprobe in Betracht. Die hier gewonnenen Ergebnisse sind daher auf dieser Basis zu werten. Für die Gewinnung eines repräsentativen Querschnittes wäre es nötig, weitere parallele Bestimmungen durch verschiedene Analysenmethoden (mindestens drei), die Anwendung internationaler Standards und radiochemischer Optimierungsverfahren einzelner Schritte der Probenvorbereitung zu veranlassen, ganz abgesehen von der Notwendigkeit einer langfristigen Forschung.

Allerdings sind die Plazentauntersuchungen mit der vorliegenden Arbeit noch nicht abgeschlossen und sollen noch auf andere Spurenelemente und Bestimmungsverfahren erweitert werden. Da das instrumentelle Verfahren der Aktivierungsanalyse mit Neutronen weitgehend frei von systematischen Fehlern,Blindwerten und Adsorptionseffekten, und deshalb gut geeignete für Kontrollbestimmungen ist, haben wir weiterhin das hier beschriebene Trennsäulensystem verwendet, um weitere Ermittlungen an dem Spurenelementgehalt der Humanplazenta zu erzielen.

Die Plazenta verbindet den Fetus mit den uterinen Wänden, uns ist dasjenige Organ, durch das die Ernährungs-, die Atmungs- und die exkretorischen Funktionen des Fetus verlaufen. Obwohl seit langem bekannt ist, daß im Laufe der Gravidität erhebliche Mengen an Mineralstoffen von maternalen in das fetale Blut übergehen, finden sich in der Literatur

Tabelle 42 Gesamte Ergebnisse der Bestimmungen von Spurenelementen in normalen bluthaltigen Humanplazenten aus dem Raum Berlin West (im ppm bezogen auf Frischgewicht)

Spurenelement	Spektralphotometrie	Flammen-AAS	Flammenlose AAS
Zink	11,13 ± 0,62	-	11,83 ± 0,72
Kupfer	1,21 ± 0,18	-	1,30 ± 0,16
Cadmium	-	-	0,043 ± 0,010
Mangan	-	-	0,158 ± 0,018
Eisen	-	-	119,9 ± 15,4
Magnesium	-	102,2 ± 10,4	-
Blei	-	-	0,157 ± 0,029
Quecksilber	-	-	0,286 ± 0,037

nur wenige Angaben über Mineralstoff-Gehalte in Plazenten.

Unser Verdacht auf eine Umweltbelastung mit toxischen Schwermetallen - hier im Berliner Gebiet - widerspiegelt sich auch in der menschlichen Plazenta. In Anbetracht der hoch stoffwechselaktiven Plazenta ist eine Störung von Enzymsystemen durch Schwermetalleinlagerung möglich. Die sich daraus ergebenden Probleme in den Stoffwechselmechanismen dieses für die Schwangerschaft unentbehrlichen Organs, sind derzeit noch nicht abschätzbar. Dabei entstehen Gefahren, die bei der relativen Häufigkeit des Auftretens von induzierten Erkrankungen veheerende Folgen haben, sowohl beim Erwachsenen als auch beim Kind und ganz speziell beim Embryo, mit seiner erheblichen Wachstumsgeschwindigkeit und der damit verbundenen Empfindlichkeit seiner durch Schwermetalle vulnerablen Enzymsysteme. Offensichtlich birgt nicht nur die Empfindlichkeit des Ungeborenen an sich, sondern gerade auch die besondere Fähigkeit wachsenden Gewebes, Schwermetalle stärker zu speichern, besondere Gefahren im frühkindlichen Wachtstumsabschnitt.

Aus den von uns bisher an der menschlichen Plazenta durchgeführten Analyse ergibt sich eindeutig, daß es im humanmedizinischen Bereich nicht ganz sinnvoll ist, für bestimmte Elemente Normalwerte in Organen oder Körperflüssigkeiten anzugeben. Die Diskrepanzen zwischen den in der Literatur angegebenen Spurenelement-Zusammensetzungen sind nach unserer Ansicht sowohl auf die Variabilität der Menschen als auch auf die verschiedenen Methodiken zurückzuführen. In Zukunft müssen darüber hinaus komplexe Bedingungen wie Umwelt, Ernährung, Arzneimittelaufnahme, Jahreszeit, Alter, Geschlecht des Neugeborenen, etc. berücksichtigt werden. Allerdings haben wir mit den Weitverstreuten Literaturangaben über Referenzwerte für die zu bestimmenden Spurenelemente keine hochsignifikante Abweichung gefunden.

Das Problem der Spurenanalytik liegt in der ständigen selbstkritischen Bewertung ihrer Methoden und der erzielten Ergebnisse. Ging es gestern noch um Mengen im ppm-Bereich, so sind es heute auch ppb und selbst ppt in den Bereichen der Nachweisbarkeit gelungen. Jedoch je kleiner die Gehalte , um so stärker fallen systematische und methodische Fehler ins Gewicht, die bei den verringerten Verfahren nach dem bisherigen Stand der Technik nicht mit letzter Sicherheit auszuschließen sind. Die Spurenanalytiker befinden sich bei ihrem unablässigen Streben, möglichst kleine Mengen in möglichst kleinen Proben mit möglichst großer Genauigkeit in möglichst kurzer Zeit bei möglichst geringen Kosten nachzuweisen, vielfach noch in einer nicht eben glücklichen Situation. Mehr und mehr werden die Analytiker aber nicht nur mit dem Problem der Zuverlässigkeit, sondern auch dem der Wirtschaftlichkeit ihrer Arbeit konfrontiert, denn die Spurenanalytik bedient sich heute eines Arsenals empfindlicher und entsprechend teurer Apparate. Insgesamt ist die Technisierung der Laboratorien so aufwendig geworden, daß die Forderung nach möglichst wirtschaftlicher Nutzung auch dem eng agiertesten Wissenschaftler einleuchten muß.

In diesem Zusammenhang paßt insbesondere die Analyse von Spurenelementen in biologischen Geweben und Flüssigkeiten.

In den meisten klinisch-chemischen Laboratorien werden heutzutage noch infolge des apparativen Aufwandes spektralphotometrische Methoden bevorzugt und etwa 75% aller klinisch-chemischen Bestimmungen werden durch Spektralphotometrie ausgeführt. Sie kann in einem weiten Arbeitsbereich angewendet werden, ja sogar bis ppb-Bereich. Deswegen wurden hier zwei spektralphotometrische Bestimmungsmethoden für Kupfer und Zink erarbeitet und erprobt, die im Vergleich mit dem FAAS-Analyse relativ einfach und zuverlässig sind, und noch hinreichende Empfindlichkeit aufweisen.

In jüngster Zeit findet insbesondere die Atom-Absorptions-Spektroskopie eine stetig steigende Anwendung in allen Stadien der anorganischen Spurenanalytik, sowohl

in medizinischen Bereichen als in der Umweltkontrolle. Obwohl sie keineswegs eine Multielementanalyse gestattet, bietet sie die Möglichkeit viele Proben schnell auf den Gehalt von bestimmten Elementen zu untersuchen. Die Flammen-AAS ist bereits eine äußerst empfindliche Analysenmethode und der Einsatz des flammenlosen Verfahrens verbessert die Empfindlichkeit für viele Elemente noch einmal um 2 - 3 Größenordnungen. Aber im Gegensatz zur Flammen-AAS haben hier geringe Änderungen der Matrix einen größeren Einfluß auf das Analysenergebnis. Aus den vorliegenden Bestimmungen läßt sich folgern, daß die FAAS im Graphitofen ein sehr störanfälliges Verfahren ist und nur dann optimal eingesetzt werden kann, wenn das zu bestimmende Element in isolierter Form in schwach saurer Lösung vorliegt.

In der analytischen Praxis hat man es in den seltesten Fällen mit einer so einfachen Matrix zu tun und deswegen, insbesondere bei der Schwermetallanalyse, ist oft ein Trennung-Anreicherungs-Verfahren nötig. Bei dem hier geschilderten Trennsäulensystem besteht grundsätzlich die Möglichkeit, alle Schwermetalle biologischer Aufschlußmaterialien mit Hilfe der flammenlosen AAS zuverlässig zu bestimmen.

Einer der Gründe für die rasche Entwicklung des Gebietes der anorganischen Biochemie (Bioanorganik) in jüngster Zeit ist der Befund, daß Schwerelemente sich in der Biosphäre ständig anreichern und in vielen biologischen Prozessen eingreifen können. Erst jetzt beginnt man zu begreifen, daß auch ein Element, das nur selten in der Erdkruste vorkommt, aber nun vom Menschen in die Biosphäre transferiert und dort angereichert wird, die Menschheit plötzlich vor schwerwiegenden Problemen stellen kann. Die Problemelemente, zu den in erster Linie Quecksilber,Cadmium und Blei gehören, sind überraschenderweise in sehr niedrigen Gehalten in vielen umweltrelevanten Materialien selbst

exakt zu erfassen, und berühren dabei bereits die Grenze der herkömmlichen analytischen Methodik und Denkweise. Viele der Bestimmungsverfahren erwiesen sich als zu unempfindlich oder zu aufwendig. Durch Kombination bekannter oder Erfindung völlig neuer Techniken müssen deshalb Analysenmethoden entwickelt werden, die eine quantitative Bestimmung kleinster Elementmengen in Gegenwart eines millionenfachen Überschusses an Fremdstoffen erlauben. Aber eine zuverlässige Spurenanalytik benötigt nicht immer bessere und teurere Apparaturen. Die vorliegende Arbeit soll ein Beispiel dafür sein.

Schließlich sind bei beruflicher oder umweltbedingter Belastung Kontrollen des Schwermetallpegels im menschlichen Körper notwendig. Aufgrund der extrem wichtig physiologischen Funktion und der u.U. leichten Zugänglichkeit der Humanplazenta ist deren Analyse heutzutage zur gelegentlichen Überwachung auch sinnvoll.

Literaturverzeichnis

1. Martius, H.: Lehrbuch der Geburtshilfe. 6.Aufl. (1966) u. 9.Aufl. (1977), Georg Thieme Verlag Stuttgart.
2. Starck, D.: Embryologie. 3.Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart 1975.
3. Harper, H.A., G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss: Physiologische Chemie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1975.
4. World Health Organization: Trace elements in human nutrition. In: WHO, Technical report series Nr. 532, Geneva 1973.
5. Frieden, E.: Sci. Am. 227 (1972) 52
6. Nielsen, F.H.: Food Technol. 28 (1974) 38
7. Becker, R.S., W.E. Wentworth: Allgemeine Chemie. Band 3, DTV Georg Thieme Verlag Stuttgart 1973.
8. Vahrenkamp, H.: Chem. i. u. Zeit 7 (1973) 97
9. Scrutton, M.C.: Metal enzymes. In: Inorganic biochemistry. Vol. 1 und 2, G.L. Eichhorn, Editor, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam Oxford New York 1973.
10. Thomson, A.J.: Nachr. Chem. Techn. 12 (1977) 708
11. Stengel, H.: Naturw. Rdsch. 27 (1974) 306
12. Hope-Seyler / Thierfelder: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-chemischen Analyse. III Band. Bausteine des Tierkörpers. I. Bandteil. 10.Aufl., Springer-Verlag Berlin Göttingen Heidelberg 1955.
13. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 189 (1958) 177
14. Tölg, G.: Z. Anal. Chem. 283 (1977) 257
15. Hecht, H.: Beckman Report 1+2 (1975) 12
16. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 190 (1957) 8
17. Bock, R., S. Gorbach: Mikrochim. Acta 5 (1958) 593
18. Uteg, K.-H., P. Kurze, E. Uhleman, R. Kreil: Dtsch. Gesundheitsw. 26 (1971) 1785
19. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 191 (1958) 1
20. De Jorge, F.B., D. Delascio, C. Canato: Matern. Infanc. (S. Paulo) 25 (1966) 557

21. Dawson, E.B., H.A. Croft, R.R. Clark, W.J. McGanity: Am. J. Obst. Gynec. 103 (1969) 1144
22. Thieme, R., P. Schramel, B.-J. Klose, E. Waidl: Geburtsh. u. Frauenheilk. 34 (1974) 36
23. Thieme, R., P. Schramel, B.-J. Klose, E. Waidl: Geburtsh. u. Frauenheilk. 35 (1975) 349
24. Thieme, R., P. Schramel, E. Kurtz: Geburtsh. u. Frauenheilk. 37 (1977) 756
25. Smith, G.F., D.H. Wilkins: Anal. Chem. 25 (1953) 510
26. Informaçōes Merck n.º 94: Rev. Bras. Quím. Jan (1970) 22
27. Borchardt, LeRoy G., J.P. Buttler: Anal. Chem. 29 (1957) 414
28. Timmen, H., J. Blüthgen: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 153 (1973) 283
29. Van De Bogart, M., H. Beinert: Anal. Biochem. 20 (1967) 325
30. Martins, A.F.: Comparaçāo de métodos espectroscópicos na determinaçāo de cobre em amostras de solo. Tese de Mestrado, Pontifícia Univ. Cat. Rio de Janeiro, Brasil 1974.
31. Beyer, G., G. Hillmann: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11 (1973) 121
32. Blair, D., H. Diehl: Talanta 7 (1961) 163
33. Buttler, E.J., D.H.S. Forbes: Anal. Chim. Acta 33 (1965) 59
34. Butler, E.J., G.E. Newman: Clin. Chim. Acta 11 (1965) 452
35. Bowness, J.M., R.A. Morton, M.H. Shakir, A.L. Stubbs: Biochem. J. 51 (1952) 521
36. Page, E.R.: Analyst 90 (1965) 435
37. Silva, M.E.M.S.: Analyst 99 (1974) 408
38. Sampaio, M.R.P., N.S. Fernandes, M. Santos: Arq. Inst. Biol. S. Paulo 33 (1966) 67
39. Cheng, K.L., R.H. Bray: Anal. Chem. 25 (1953) 655
40. Kimura, K., Y. Murakami: Mikrochim. Acta (1951) 958
41. Kröller, E.: Dtsch. Lebensm. Rdsch. 66 (1970) 190
42. Eden, A., H.H. Green: Biochem. J. 34 (1940) 1202
43. Brückmann, G., S.G. Zondek: Biochem. J. 33 (1939) 1845
44. Abson, D., A.G. Lipscomb: Analyst 82 (1957) 152
45. Analytical Methods Committee: Analyst 88 (1963) 253
46. Luke, C.L.: Anal. Chim. Acta 32 (1965) 286

47. Dezsö, I., T. Fülop: Mikrochim. Acta (1959) 592
48. Dittel, F.: Z. Anal. Chem. 229 (1967) 188
49. Smith, A.C.: J. Dairy Sci. 50 (1967) 664
50. Giorgio, A.J., G.E. Cartwright, M.M. Wintrobe: Am. J. Clin. Pathol. 41 (1964) 22
51. Abbot, D.C., J.R. Harris: Analyst 87 (1962) 497
52. Russel, G., P.J. Hart: Analyst 83 (1958) 202
53. Jones, P.D., E.J. Newman: Analyst 87 (1962) 637
54. Gallo, J.R., F.A.S. Coelho: Bragantia (S.Paulo) 24 (1965) 36
55. Riley, J.P., P. Sinhaseni: Analyst 83 (1958) 299
56. Middleton, K.R.: Analyst 90 (1965) 234
57. Peterson, R.E., M.E. Bollier: Anal. Chem. 27 (1955) 1195
58. Brown, J.M.M.: J.S. Afr. vet. med. Ass. 39 (1968) 3
59. Rice, E.W.: J. Lab. Clin. Med. 55 (1960) 325
60. Stoner, R.E., W. Dasler: Clin. Chem. 10 (1964) 845
61. Waroschinek, O., H.H. Tagger: Anal. Chim. Acta 35 (1966) 109
62. Matsuba, Y., Y. Takahashi: Anal. Biochem. 36 (1970) 182
63. Dittel, F.: Z. Anal. Chem. 229 (1967) 193
64. Schilt, A.A.: Analytical applications of 1,10-Phenanthroline and related compounds. Int. Series of Monographs in Analytical Chemistry, V. 32. Pergamon Press, Braunschweig 1969.
65. Umland, F., A. Janssen, D. Thierig, G. Wünsch: Theorie und praktische Anwendung von Komplexbildern. Methoden der Analyse in der Chemie, Band 9. Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt i.M. 1971
66. Burger, K.: Organic reagents in metal analysis. Int. Series of Monographs in Analytical Chemistry, V. 24. Pergamon Press, Braunschweig 1973.
67. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 190 (1958) 638
68. Eckschlager, E.: Errors measurements & results in chemical analysis. Van Nostrand Reinhold Co., London 1969
69. Schlettwein-Gsell, D., S. Mommsen-Straub: Spurenelemente in Lebensmitteln. Int. Z. Vit. -Ernährungsforsch. Beiheft 13, Hans Huber, Bern 1973.
70. Reinhold, J.G.: Clin. Chem. 21 (1975) 476

71. Smith, C.J.: Sci. 181 (1973) 954
72. Scharpf, L.G., I.D. Hill, P.L. Wright, J.B. Plank, M.L. Keplinger, J.C. Calandra: Nature 239 (1972) 231
73. Ribas, B., M. Dean, W. Schmidt: Zbl. Arbeitsmed. 4 (1977) 81
74. Burch, R.E., H.K.J. Hahn, J.F. Sullivan: Clin. Chem. 21 (1975) 501
75. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 191 (1958) 101
76. Bradford, G.R., P.F. Pratt, F.L. Blair, B. Goulben: Soil Sci. 100 (1965) 309
77. Helwig, H.L., E.M. Hoffer, W.C. Thielen, A.E. Alcocer, D.R. Hotelling, W.H. Rogers: Am. J. Clin. Pathol. 45 (1966) 160
78. Higgins, M.L., W.F. Pickering: Talanta 18 (1971) 986
79. Kägl, J.H., B.L. Vallee: Anal. Chem. 30 (1958) 1345
80. Miller, W.J., J.K. Miller: J. Dairy Sci. 46 (1963) 581
81. Page, E.R.: Analyst 90 (1965) 435
82. Parkash, S., R. Jenness: J. Dairy Sci. 50 (1967) 127
83. Schöberl, A., R. Musche: Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 (1961) 471
84. Stanton, R.E., A.J. McDonald, I. Carmichael: Analyst 87 (1962) 134
85. Westöö, G.: Analyst 88 (1963) 387
86. Wolff, H.: Biochem. Z. 325 (1954) 267
87. McCall, J.T., G.K. Davis, T.W. Stearns: Anal. Chem. 30 (1958) 1345
88. Mizuno, N., T. Ogata, K. Takao: Bunseki Kagaku 18 (1969) 1077
89. Passos, Manuel dos: Determinação de traços de zinco em amostras de solo por métodos analíticos espectroscópicos. Tese de mestrado, Pont. Univ. Cat. Rio de Janeiro, Brasil 1975.
90. Platte, J.A., V.M. Marcy: Anal. Chem. 31 (1959) 1226
91. Pratt, P.F., G.B. Bradford: Soil Sci. Soc. Am. (Proc.) 22 (1958) 399
92. Sadilková, M.: Mikrochim. Acta 5 (1968) 934
93. Kröller, E.: Dtsch. Lebensmitt. -Rdsch. 66 (1970) 190
94. Evans, W.E., G.S. Sayers: Analyst 97 (1972) 453
95. Shibata, S., M. Furakawa, S. Sasaki: Anal. Chim. Acta 51 (1970) 271

96. Iwantscheff, G.: Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse. 2.Aufl. Verlag Chemie Weinheim 1958.
97. Wolff, H.: Biochem. Z. 320 (1950) 291
98. Schmider, P.: Beckman Report 1+2 (1975) 3
99. Welz, B.: CZ-Chemie Technik 1 (1972) 373
100. Welz, B.: Atom-Absorptions-Spektroskopie. 2.Aufl. Verlag Chemie, Weinheim 1975.
101. Volland, G., G. Kölblin, P. Tchöpel, G. Tölg: Z. Anal. Chem. 284 (1977) 1
102. Zander, A.T.: Int. Lab. Jan/Feb (1977) 15
103. Hauck, G.: Z. Anal. Chem. 267 (1973) 337
104. Reynolds, R.J., K. Aldous: Atomic absorption spectroscopy. Charles Griffin, London 1970.
105. Robinson, J.W.: Atomic absorption spectroscopy. Marcel Dekker, New York 1966.
106. Ramirez-Muñoz, J.: Atomic-absorption spectroscopy. Elsevier Publishing Co., New York, London, Amsterdam 1968.
107. Slavin, W.: Atomic absorption spectroscopy. Interscience Publishers, New York, London, Sydney 1968.
108. Evenson, M.A., C.T. Anderson, Jr.: Clin. Chem. 21 (1975) 537
109. Momcilovic, B., B. Belonje, B.G. Shah: Clin. Chem. 21 (1975) 588
110. Johnson, C.A.: Anal. Chim. Acta 81 (1976) 69
111. Doyle, J.J., W.H. Pfander: J. Nutr. 105 (1975) 599
112. Theron, P.F., R. Rimer, H.A. Nicholls, W.J. Ehret: J.S. Afr. vet. Ass. 44 (1973) 271
113. Maurer, J.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 165 (1977) 1
114. Dujmovic, M.: Beckman Report 1+2 (1976) 9
115. Kirchgeßner, M., K.R. Neeße: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 161 (1976) 1
116. Kelson, J.R., R.J. Shamberger: Clin. Chem. 24 (1978) 240
117. Heinemann, G.: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 10 (1972) 467
118. Lee, K.-T., E. Jacob: Mikrochim. Acta (1974) 65
119. Delves, H.T., G. Shepherd, P. Vinter: Analyst 96 (1971) 260

120. Hanig, R.C., M.H. Aprison: Anal. Biochem. 21 (1967) 169
121. Parker, M.M., F.L. Humoller, D.J. Mahler: Clin. Chem. 13 (1967) 40
122. Feder, H.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 77 (1970) 625
123. Mertz, W.: Clin. Chem. 21 (1975) 468
124. Hsu, J.M., W.L. Anthony: Clin. Chem. 21 (1975) 544
125. Burch, R.E., R.V. Williams, H.J.K. Hahn, M.M. Jetton, J.F. Sullivan: Clin. Chem. 21 (1975) 568
126. Versieck, J., F. Barbier, A. Speecke, J. Hoste: Clin. Chem. 21 (1975) 578
127. Prasad, A.S., E.B. Schoomaker, J. Ortega, G.J. Brenner, D. Oberleas, F.J. Oelshgel, Jr.: Clin. Chem. 21 (1975) 582
128. Hurley, L.S., G. Cosens, L.L. Theriault: J. Nutr. 106 (1976) 1261
129. Doyle, J.J., W.H. Pfander: J. Nutr. 105 (1975) 599
130. Hein, H., W. Schrader: Perkin-Elmer Analysentechnischen Berichte, Heft 40 (1975)
131. Creason, J.P., T.A. Hinners, J.E. Bumgarner, C. Pinkerton: Clin. Chem. 21 (1975) 603
132. Bogden, J.D., R.A. Troiano, M.M. Joselow: Clin. Chem. 23 (1977) 485
133. Hilderbrand, D.C., D.H. White: Clin. Chem. 20 (1974) 148
134. Brandt, G.: Beckman Report 1+2 (1975) 32
135. Pirke, K.M., D. Stamm: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8 (1970) 61
136. Herrmann, R., W. Lang: Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1 (1963) 182
137. Murthy, L., E.E. Menden, P.M. Eller, H.G. Petering: Anal. Biochem. 53 (1973) 365
138. Analytical Methods Committee: Analyst 96 (1971) 741
139. Burger, N., V. Karas-Gasparec: Talanta 20 (1973) 779
140. Sunderman, F.W., Jr., N.O. Roszel: Am. J. Clin. Pathol. 48 (1967) 286
141. Rebmann, H., H.-J. Höth: Milchwissenschaft 26 (1971) 411
142. Evenson, M.A., B.L. Warren: Clin. Chem. 21 (1975) 619

143. Janßen, A., H. Melchior, D. Scholtz: Z. Anal. Chem. 283 (1977) 1
144. Woidich, H., W. Pfannhauser: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 155 (1974) 72
145. Szadkowski, D., H. Schwarz, K.-H. Schaller, G. Lehnert: Arch. Hyg. Bakteriol. 152 (1969) 1
146. Essing, H.-G., K.-H. Schaller, D. Szadkowski, G. Lehnert: Arch. Hyg. Bakteriol. 153 (1969) 460
147. Umweltbundesamt: Luftqualitätskriterien für Cadmium. Berichte des Umweltbundesamtes 4, 1977.
148. Sugawara, N.: Toxicol. Appl. Pharmacol. 42 (1977) 377
149. Magos, L., M. Webb: Arch. Toxicol. 36 (1976) 53
150. Welch, R.M., W.A. House, D.R. Van Campen: Nutr. Rep. Int. 17 (1978) 35
151. Parizek, J.: J. Reprod. Fert. 7 (1964) 263
152. Mulvihill, J.E., S.H. Gamm, V.H. Ferm: J. Embriol. Expl. Morph. 24 (1970) 393
153. Gendo, D.: Über den Cadmium- und Zinkgehalt der Verkalkungen aus menschlichen Placenten. Med. Dissertation, Aachen 1976.
154. Friberg, L., M. Piscator, G.F. Nordberb, T. Kjellström: Cadmium in the environment. 2nd. Ed., CRC Press Cleveland Ohio, USA 1974
155. Chaube, S., H. Nishimura, C.A. Swinyard: Arch. Environ. Health 26 (1973) 237
156. Thürauf, J., K.-H. Schaller, E. Engelhardt, K. Gossler: Int. Arch. Occup. Environ. Health 36 (1975) 19
157. Oelschläger, W., W. Lautenschläger: Z. Anal. Chem. 287 (1977) 28
158. Lauwerys, R., J.-P. Buchet, H. Roels, A. Berlin, J. Smeets: Clin. Chem. 21 (1975) 551
159. Crosby, N.T.: Analyst 102 (1977) 225
160. Sperling, K.-R.: Z. Anal. Chem. 287 (1977) 23
161. Laub, E., F. Waligorski, R. Woller: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 164 (1977) 269
162. Schulte-Löbbert, J.F., G. Bohn: Arch. Toxicol. 37 (1977) 155
163. Sperling, K.-R., B. Bahr, K. Kremling: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 163 (1977) 87

164. Blood, E.R., G.C. Grant: Anal. Chem. 47 (1975) 1438
165. Lundgren, G.: Talanta 23 (1976) 309
166. Posma, F.D., J. Balke, R.F.M. Herber, E.J. Stulk: Anal. Chem. 47 (1975) 834
167. Höllerer, G., E. Coduro: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 163 (1977) 260
168. Anders, U., G. Hailer: Z. Anal. Chem. 278 (1976) 203
169. Seeger, R.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 166 (1978) 23
170. Jönsson, H.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 160 (1976) 1
171. Boppel, B.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 161 (1976) 111
172. Boppel, B.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 160 (1976) 299
173. Wegscheider, W., G. Knapp, H. Spitzy: Z. Anal. Chem. 283 (1977) 97
174. Hannaker, P., T.C. Hughes: Anal. Chem. 49 (1977) 1485
175. Bergner, K.G., B. Lang: Dtsch. Lebensm. -Rdsch. 67 (1971) 121
176. Paus, P.E.: Z. Anal. Chem. 264 (1973) 118
177. Vesterberg, O., T. Bergström: Clin. Chem. 23 (1977) 555
178. Perry, E.F., S.R. Koirtyohann, H.M. Perry, Jr.: Clin. Chem. 21 (1975) 626
179. Stutz, W., H. Schaub, W. Stohler, H.R. Strauss: Labo (Sonderheft Biochem. Anal.) April (1978) 311
180. Golimowski, J., P. Valenta, M. Stoeppler, H. W. Nürnberg: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 107
181. Halvorsen, C., E. Steinnes: Z. Anal. Chem. 274 (1975) 199
182. Siegmund, C., K. Bächmann: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 164 (1977) 1
183. Welz, B., E. Wiedeking, H.D. Schulze, W. Siegl: Angew. Atom-Absorptions-Spektroskopie (Perkin-Elmer) Heft 1, 1976
184. Welz, B.: Z. Anal. Chem. 279 (1976) 103
185. Hein, H., W. Schrader: Angew. Atom-Absorptions-Spektroskopie (Perkin-Elmer) Heft 3, 1976.
186. Harbach, D., H. Diehl: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 145
187. Buttgereit, G.: Perkin-Elmer Analysentechnischen Berichte Heft 26, 1972.

188. Schlage, Von C.: Med. u. Ernäh. 13 (1972) 49
189. Underwood, E.J.: Traces elements in human and animal nutrition. 3rd. Ed., Academic Press, New York London 1971.
190. Lang, K.: Wasser, Mineralstoffe, Spurenelemente. UTB, Steinkopf, Darmstadt 1974.
191. Nonova, D., B. Evtimova: Talanta 20 (1973) 1347
192. Dittel, F.: Z. Anal. Chem. 228 (1967) 412
193. Beyer, W., O. Wawschinek, R.D. Ott: Mikrochim. Acta 2 (1967) 233
194. Sastry, K.S., N. Raman, P.S. Sarma: Anal. Chem. 34 (1962) 1302
195. Srivastava, S.P., K.P. Pandya, S.H. Zaidi: Analyst 94 (1969) 823
196. Gustin, V.K., T.R. Sweet: Anal. Chem. 36 (1964) 1674
197. Fernandez, A.A., C. Sobel, S.L. Jacobs: Anal. Chem. 35 (1963) 1721
198. Kakác, B., Z.J. Vejdelek: Handbuch der Kolorimetrie. Band III. Kolorimetrie in der Biologie, Biochemie und Medizin. 2.Teil, VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1966
199. Dittel, F.: Z. Anal. Chem. 229 (1967) 193
200. Weisz, H., H. Ludwig: Anal. Chim. Acta 62 (1972) 125
201. Sachdev, S.L., J.W. Robinson, P.W. West: Anal. Chim. Acta 38 (1967) 499
202. Ormer, D.G. Van, W.C. Purdy: Anal. Chim. Acta 64 (1973) 93
203. Korkisch, J., H. Hübner: Mikrochim. Acta (1976) 311
204. Mahoney, J.P., K. Sargent, M. Greland, W. Small: Clin. Chem. 15 (1969) 312
205. Bradfield, E.G.: Analyst 99 (1974) 403
206. Suzuki, M., W.E.C. Wacker: Anal. Biochem. 57 (1974) 605
207. Alt, F., H. Massmann: Z. Anal. Chem. 279 (1976) 100
208. Belling, G.B., G.B. Jones: Anal. Chim. Acta 80 (1975) 279
209. Mischel, W.: Zbl. Gynäk. 78 (1956) 1089
210. Püschel, R., E. Lassner, K. Katzengruber: Z. Anal. Chem. 223 (1967) 414
211. Analytical Methods Committee: Analyst 103 (1978) 521

212. Koch, O.G., G.A. Koch-Dedic: Handbuch der Spurenanalyse. Teil 1, Springer-Verlag Berlin, 1974.
213. Versieck, J., J. Hoste, F. Barbier, H. Mischels, J. De Ruder: Clin. Chem. 23 (1977) 1301
214. Zilkens, J.: Z.Anal. Chem. 290 (1978) 109
215. Stanton, R.E.: Lab. Pract. 23 (1974) 233
216. Schmidt, W.: Z. Anal. Chem. 243 (1968) 198
217. Berndt, H., E. Jackwerth: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 105
218. Danielsson, L.-G., B. Magmisson, S. Westerlund: Anal. Chim. Acta 98 (1978) 47
219. Zielkowski, R., K. Bächmann: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 143
220. Höhn, R., F. Umland: Z. Anal. Chem. 258 (1972) 100
221. Buddecke, E.: Grundriss der Biochemie. 5.Aufl., W. De Gruyter Berlin New York 1977
222. Rapport, S.M.: Medizinische Biochemie. 7.Aufl., VEB Verlag Volk und Gesundheit Berlin 1977.
223. Mischel, W.: Arch. Gynäk. 190 (1958) 384
224. De Jorge, F.B., D. Delascio, C. Canato: Matern. Infanc. (S. Paulo) 25 (1966) 581
225. Becker, K.: Dtsch. tierärztl. Wschr. 81 (1974) 249
226. Dawson, E.B., H.A. Croft, R.R. Clark, W.J. McGanity: Am. J. Obst. Gynec. 102 (1968) 354
227. Langmyhr, F.J., P.E. Paus: Anal. Chim. Acta 43 (1968) 397
228. Belt, C.B., Jr.: Anal. Chem. 36 (1967) 676
229. Haeckel, R., W.R. Külpmann: Beckman Report 1+2 (1977) 8
230. Tausch, W., H. Gausmann, K. Böttger: Z. Anal. Chem. 279 (1976) 102
231. Chang, T.L., T.A. Gover, W.W. Harrison: Anal. Chim. Acta 34 (1966) 17
232. Roach, A.G., P. Sanderson, D.R. Williams: Analyst 93 (1968) 42
233. Tölg, G., I. Lorenz: Chem. i. u. Zeit 11 (1977) 150
234. Kinrade, J.D., J.C. Van Loon: Anal. Chem. 46 (1974) 1894
235. Koirtyohann, S.R., J.W. Wen: Anal. Chem. 45 (1973) 1986
236. Knapp, G., B. Schreiber, R.W. Frei: Anal. Chim. Acta 77 (1975) 293

237. Morrison, G.H., H. Freiser: Solvent extraction in analytical chemistry. John Wiley & Sons, New York 1957.
238. Hellmann, H.: Z. Anal. Chem. 289 (1978) 24
239. Dornemann, A., H. Kleist, W. Görgens: Z. Anal. Chem. 284 (1977) 97
240. Willis, J.B.: Anal. Chem. 34 (1962) 614
241. Brooks, R.R., B.J. Presley, I.R. Kaplan: Talanta 14 (1967) 809
242. Yanagisawa, M., M. Suzuki, T. Takeuchi: Anal. Chim. Acta 43 (1968) 500
243. Brooks, R.R., B.J. Presley, I.R. Kaplan: Anal. Chim. Acta 38 (1967) 321
244. Hauffe, K., S.R. Morrison: Adsorption. Eine Einführung in die Probleme der Adsorption. W. De Gruyter Berlin New York 1974.
245. Kisser, W.: Arch. Toxicol. 37 (1977) 173
246. Höll, W., R. Hampp: Naturw. Rdsch. 27 (1974) 272
247. Umweltbundesamt: Luftqualitätskriterien für Blei. Berichte des Umweltbundesamtes 1976.
248. Bundesgesundheitsamt: Blei und Umwelt II. Beiträge zum Problem der Bleibelastung des Menschen. Berichte des Bundesgesundheitsamtes 1 / 1978.
249. Bundesgesundheitsamt: Blei und Umwelt. Berichte des Bundesgesundheitsamtes 1972.
250. Brandenberger, H.: Heavy- and semi-metals of clinical or toxicological importance. In: Clinical Biochemistry, Principles and Methods. Editors: H. Ch. Curtius and M. Roth, vol.II, W. De Gruyter, Berlin New York 1974
251. Day, J.P., M. Hart, M.S. Robinson: Nature 253 (1975) 343
252. Waldron, H.A.: Nature 253 (1975) 345
253. Wilkinson, D.R., W. Palmer: Int. Lab. May/Juny (1975) 41
254. Kuhnlein, H.V., D.H. Calloway: Am. J. Clin. Nutr. 30 (1977) 883
255. Needleman, H.L., O.C. Tuncay, I.M. Shapiro: Nature 235 (1972) 111
256. Wong, P.T.S., Y.K. Chan, P.L. Luxon: Nature 253 (1975) 263

257. Ridley, W.P., L.J. Dizikes, J.M. Wood: Sci. 197 (1977) 329
258. World Health Organization: Gesundheitsgefahren durch Schwermetalle. Umschau 72 (1972) 700
259. Chapa, R.G-., C.H.L. -Garza, G.M. -Ballesteros: Arch. Inv. Med. (Mexico) 8 (1977) 11
260. Hower, J., B. Prinz, E. Gono, H.-G. Bohlmann: Dtsch. med. Wschr. 100 (1975) 461
261. Engelhardt, E., K.-H. Schaller, R. Schiele, H. Valentin: Zbl. Bakt. Hyg., Orig. B 162 (1976) 528
262. Einbrodt, H.J., F.W. Schiereck, H. Kinny: Arch. Gynäk. 213 (1973) 303
263. Haas, T., A. Wieck, K.-H. Schaller, K. Mache, H. Valentin: Zbl. Bakt. Hyg., Orig. B 155 (1972) 341
264. Leh, H.-O.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 157 (1975) 141
265. Analytical Methods Committee: Analyst 84 (1959) 127
266. Golimowski, J., P. Valenta: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 107
267. Beitz, L.: GIT Fachz. Lab. 17 (1973) 445
268. Luke, C.L.: Anal. Chim. Acta 41 (1968) 237
269. Alt, F.: Z. Anal. Chem. 290 (1978) 108
270. Dujmovic, M., P. Adrian, E. Knözinger: Z. Anal. Chem. 272 (1974) 177
271. Amore, F.: Anal. Chem. 46 (1974) 1597
272. Cruz, R.B., J.C. Van Loon: Anal. Chim. Acta 72 (1974) 231
273. Behne, D., P. Brätter, W. Wolters: Z. Anal. Chem. 277 (1975) 355
274. Ebert, J., H. Jungmann: Z. Anal. Chem. 272 (1974) 287
275. Hudnik, V., S. Gomiscek, B. Gorenc: Anal. Chim. Acta 98 (1978) 39
276. Regan, J.G.T., J. Warren: Analyst 103 (1978) 447
277. Jackson, K.W., E. Marczak, D.G. Mitchell: Anal. Chim. Acta 97 (1978) 37
278. Ure, A.M., M.P. Hernandez-Artiga, M.C. Mitchell: Anal. Chim. Acta 96 (1978) 37
279. Geladi, P., F. Adams: Anal. Chim. Acta 96 (1978) 229
280. Wegscheider, W., G. Knapp, H. Spitzy: Z. Anal. Chem. 283 (1977) 183

281. Frech, W., A. Cedergren: Anal. Chim. Acta 88 (1977) 57
282. Jensen, F.O., J. Dolezal, F.J. Langmyhr: Anal. Chim. Acta 72 (1974) 245
283. Seeger, R., E. Meyer, S. Schönhut: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 162 (1976) 7
284. Shamsipoor, M., F. Wahdat: Z. Anal. Chem. 288 (1977) 191
285. Hein, H.: Perkin-Elmer Analysentechnische Berichte, Heft 29 (1973).
286. Kopito, L.E., M.A. Davis, H. Schwachman: Clin. Chem. 20 (1974) 205
287. Volosin, M.T., N.P. Kubasik, H.E. Sine: Clin. Chem. 21 (1975) 1986
288. Fernandez, F.J.: Clin. Chem. 21 (1975) 558
289. Boppel, B.: Z. Anal. Chem. 268 (1974) 114
290. Massmann, H.: Angew. Chem. 86 (1974) 542
291. Delves, H.T.: Analyst 95 (1970) 431
292. Popescu, I.Gh., N. Ioanid, I.S. Radian, Gh. Bors, I. Popa, A. Berechet: Farmacia (Bucharest) 6, 413-22 (1958), nach C.A. 53 (1959) 14325c
293. Franciscis, P. de, F. Boccolatte: Nature 193 (1962) 989
294. Nuorteva, P.: Naturw. Rdsch. 24 (1971) 233
295. Wood, J.M., F.S. Kennedy, C.G. Rosen: Nature 220 (1968) 173
296. Heinrichs, H.: Naturwiss. 64 (1977) 479
297. Anonym: Nachr. Chem Tech. Lab. 25 (1977) 2
298. Dujmovic, M., H.A. Winkler: Beckman Report 1+2 (1975) 36
299. Jacobs, G.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 164 (1977) 71
300. Gergely, A., K. Soós, L. Erdélyi, V. Cieleszky: Toxicol. 7 (1977) 349
301. Magos, L., M. Webb: Arch. Toxicol. 34 (1975) 17
302. Stroo, W.E., J.B. Hook: Toxicol. Appl. Pharmacol. 42 (1977) 399
303. Abelson, P.H.: Sci. 169 (1970) 237
304. Giovanoli-Jakubczak, T., M.R. Greenwood, J.C. Smith, T.W. Clarkson: Clin. Chem. 20 (1974) 222
305. Seeger, R.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 160 (1976) 303
306. Seeger, R.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 161 (1976) 115

307. Rauter, W.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 162 (1976) 1
308. Aichberger, K.: Z. Lebensm. Unters. -Forsch. 163 (1977) 35
309. Johnson, C.A., J.F. Lewin, P.A. Flemming: Anal. Chim. Acta 82 (1976) 79
310. Issaq, H.J., W.L. Zielinski, Jr.: Anal. Chem. 46 (1974) 1436
311. Dujmovic, M.: GIT-Fachz. Lab. 21 (1977) 761
312. Lo, J.M., J.C. Wei, S.J. Yeh: Anal. Chim. Acta 97 (1978) 311
313. Lenvik, K., E. Steinnes: Anal. Chim. Acta 97 (1978) 295
314. Hatch, N.R., W.L. Ott: Anal. Chem. 40 (1968) 2085
315. Helsby, C.A.: Mikrochim. Acta (1976) 307
316. Dujmovic, M., P. Adrian, E. Knözinger: Z. Anal. Chem. 272 (1974) 182
317. Lech, J.L., D.D. Siemer, R. Woodriff: Spectrochim. Acta 28 B (1973) 435
318. Riemschneider, R.: Stoffwechselaktive Organextrakte, Mitt. I, Mitt. Physiolog. chem. Institut Berlin, R. 1a, Juni 1946; Mitt. III, Untersuchungen über Plazenta-Extrakte, Druckschrift aus dem Institut für Biochemie der FU Berlin vom 22. 1.1962 (in japanischer Sprache); Mitt. VI, Resumo 16 do II Congresso Latino-Americano de Quîmicos, São Paulo, 18.11.1975, p. 44. Vgl. auch Anais de Farmácia e Quîmica S. Paulo 1976, 68-77. Riemschneider, R., E. Schultz: Alkalische Phosphatase aus Rinder-Placenten, Manuskript vom 1.10.1973

Lebenslauf

Am 26. Mai 1947 wurde ich in Sao Sepe (RS), Brasilien, als Sohn des Landwirtes Mario da Costa Martins und seiner Ehefrau Amalia Maria de Lourdes Figueiredo Martins, geb. da Silva Figueiredo, geboren. Meine 1954 in Sao Sepe begonnene Schulzeit schloß ich in Santa Maria am 25. November 1965 mit der Reifeprüfung ab. Am 1. März 1966 begann ich das Studium der Chemie an der Bundesuniversität von Santa Maria (UFSM) und erreichte das erste Studiumziel mit der Erhaltung der B.Sc.- Urkunde (Vordiplom-) am 14. November 1969. Vom März 1970 bis März 1971 arbeitete ich als Chemielehrer und ab März 1971 als wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Chemische Technologie des Chemiedepartments der UFSM. Am 26. Februar 1972 trat ich nach bestandener Aufnahmeprüfung in den "post-graduation course" des Fachbereiches Chemie der Katholischen Universität von Rio de Janeiro (PUCRJ), und am 25. Juli 1974 erhielt ich die M.Sc.- Urkunde (Diplom-) in Analytischen Chemie "mit Auszeichnung". Nach einer mit der Note "sehr gut" am 2. August 1974 abgelegten Admissionsprüfung zum 2. Niveau des post-graduation course (Promotion) brach ich meine Doktorarbeit an der PUCRJ im März 1975 ab, um mit Hilfe eines DAAD-Stipendiums im Rahmen des FU-Berlin / UFSM-Brasilien-Abkommens nach Deutschland zu kommen. Nach 6 Monaten Sprachkursus in Freiburg i. Brg. führte ich 1975 an der Freien Universität im Fachbereich Chemie mein Studium weiter und begann meine Arbeit bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. R. Riemschneider am Institut für Biochemie WE 6. Am 28. 12. 1976 ist mir von der Prüfungskommission des Fachbereiches Chemie der FU-Berlin das Haupt-Diplom anerkannt worden. Seitdem arbeite ich an meiner Doktorarbeit mit dem Theme "Über die Bestimmung von Spurenelementen in Humanplazenten".

Meine Ausbildung in der Bundesrepublik Deutschland verdanke ich den Hochschullehrern:
W. Francke, R. Frydrych, R. Riemenschneider, W. Hirschwald, G. Manecke, K.R. Mehnert, G. Fuchs, R. Heimann, G. Schneider.

Weiterhin danke ich herzlich Dr. P. Dietsch und allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie WE 6, die mich in verschiedener Weise unterstützt haben.